

# 國立交通大學

## 生物科技研究所

### 碩士論文

癌症標靶材料作用於細胞與分子機制之探討：

1. 多光子趨動標靶化奈米鑽石誘發癌細胞死亡之機制
2. anti-CEACAM6 與 anti-HER-2 單一抗原結合功能區抗體於乳癌標靶治療之研究

Cell and molecular mechanism study of cancer targeting materials :

1. The mechanism of cancer cell death for multi-photon triggered target-based nanodiamonds;
2. Application of single domain antibodies (anti-HER-2 and anti-CEACAM6) in breast cancer targeting therapy.

研究生：陳虹瑋

指導教授：張家靖

中華民國一百年七月

癌症標靶材料作用於細胞與分子機制之探討：

1. 多光子趨動標靶化奈米鑽石誘發癌細胞死亡之機制；
2. anti-CEACAM6 與 anti-HER-2 單一抗原結合功能區抗體於乳癌標靶治療之研究

Cell and molecular mechanism study of cancer targeting materials :

1. The mechanism of cancer cell death for multi-photon triggered target-based nanodiamonds;
2. Application of single domain antibodies (anti-HER-2 and anti-CEACAM6) in breast cancer targeting therapy.

研究生：陳虹瑋

Student : Hung-Wei Chen

指導教授：張家靖

Advisor : Chia-Ching Chang



Submitted to Department of Biological Science and Technology  
National Chiao Tung University  
in partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of  
Master  
in

Biological Science and Technology

July 2011

Hsinchu, Taiwan, Republic of China

中華民國一百年七月

## 癌症標靶材料作用於細胞與分子機制之探討：

### 1.多光子趨動標靶化奈米鑽石誘發癌細胞死亡之機制；

### 2.anti-CEACAM6 與 anti-HER-2 單一抗原結合功能區抗體於乳癌標靶治療之研究

學生：陳虹瑋

指導教授：張家靖 教授

國立交通大學生物科技研究所 碩士班

## 摘要

癌症的標靶治療可標定癌細胞，減少對正常細胞的傷害，故比傳統治療更有效。本研究結合奈米技術以及生物技術，發展出對癌細胞具有靶向性的奈米粒子。

在癌症細胞當中，通常會存在一些特殊表現或調控之因子，這些調控因子即為標靶治療的理想目標。本研究中以肺癌與乳癌作為模式，針對肺癌大量表現之生長激素受體、乳癌特殊表達之癌胚抗原相關細胞黏著分子 6 (Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6, CEACAM6)與人類表皮生長因子受體 2 (Human epidermal growth factor receptor 2, HER-2)，分別設計出標靶化之奈米粒子與單一抗原結合功能區抗體作為標靶治療之工具。

許多癌症細胞會內生性分泌生長因子，利用生長激素在腫瘤細胞的特殊表現，使羧酸化奈米鑽石與重組的生長激素受體結合蛋白以及綠色螢光蛋白接合成一複合體，此複合體能夠專一性的結合於具有高度表現生長激素受體的 A549 人類非小細胞肺腺癌細胞株的細胞膜上。細胞毒性測試結果指出，羧酸化奈米鑽石-生長激素受體結合蛋白-綠螢光蛋白複合體具有低生物毒性，高度生物相容之特性。當細胞羧酸化奈米鑽石-生長激素受體結合蛋白-綠螢光蛋白複合體接合於 A549 肺腺癌細胞表面，同時經由脈衝雷射的誘導使得奈米鑽石爆炸並造成細胞表面受損，並經由細胞凋亡機制導致細胞死亡。因此，此實驗之設計猶如一奈米手術，或許能夠建立為一種新的癌症治療策略，亦或為生物醫學所應用。

另一方面，癌胚抗原相關細胞黏著分子 6 與人類表皮生長因子受體 2 皆高度表現於乳癌細胞當中，且與乳癌之進程相關。藉由免疫駱馬後，分離、純化出單一抗原結合功能區抗體，並以抗體保守區(conserved region, Fc)接合不同的單一抗原結合功能區抗體，測試其對乳癌細胞株 MCF-7 之影響。同時，我們也以歐洲紫杉醇作為對照組與單一抗原結合功能區抗體之治療效果作比較。由實驗結果顯示，針對乳癌之進程，單一抗原結合功能區抗體可以經由誘導乳癌細胞凋亡進而抑制腫瘤細胞之增生，並且藉由減低基質金屬蛋白酶 2 (MMP-2)、基質金屬蛋白酶 9 (MMP-9)之活性，以及抑制單核球趨化蛋白 1 (MCP-1)、細胞內黏附因子 1 (ICAM1)、血管細胞黏附因子 1 (VCAM-1)等等，以減少巨噬細胞浸潤乳癌細胞之

能力、降低乳癌細胞遷移、侵犯、轉移，以及阻礙癌症血管新生、使腫瘤體不再增大。相較於歐洲紫杉醇之療效，單一抗原結合功能區抗體更為一具有臨床潛力之抗體藥物。

總而言之，癌症的標靶化治療對周圍細胞不具傷害性，且可針對不同癌症細胞所表現特定分子，設計擁有較佳治療效果的分子或方法。於本實驗中，以針對生長激素受體所設計的奈米鑽石複合物，經由奈秒雷射誘發導致癌細胞凋亡，為高專一性的光敏療法平台開發。而針對 CEACAM6 與 HER-2 的單一抗原結合功能區抗體，更具全面性阻止癌症進程的療效，故此研究之奈米鑽石複合物與單一抗原結合功能區抗體分別為非小細胞肺腺癌與乳癌標靶治療之理想因子。





## **Cell and molecular mechanism study of cancer targeting materials:**

**1. The mechanism of cancer cell death for multi-photon triggered target-based nanodiamonds;**

**2. Application of single domain antibodies (anti-HER-2 and anti-CEACAM6) in breast cancer targeting therapy.**

Student : Hung-Wei Chen

Advisor : Dr. Chia-Ching Chang

Department of Biological Science and Technology

National Chiao Tung University

### **Abstract**

Targeted cancer therapy is more effective than conventional treatments and less harmful to normal cells. In this study, we have combined nanotechnology and biotechnology to develop a novel cancer cell targeting therapy.

Growth factor are autokines, will be overexpressed in various tumors. We expressed recombinant green fluorescence protein (GFP) and growth hormone receptor binding protein (GHRBP) which could specifically recognize growth hormone receptor (GHR) which is located on cell surface of the non-small cell lung cancer cell line, A549. By conjugated with carboxylated nanodiamond (cND) and expressed protein, the cND-GHRBP-GFP complex shows a low toxicity, high biocompatible, specificity, and observable properties. Following recognizing by cND-GHRBP-GFP, A549 were triggered by pulse laser. Results indicate that laser pulsed cND-GHRBP-GFP nano-blast recognized A549 will induce cell surface damage and resulting cell death by apoptosis pathway. According, we have developed a novel strategy for non-small cell lung cancer targeting therapy by combining nanodiamond conjugated hormone receptor binding protein and laser pulse.

Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6 (CEACAM6) and human epithelial growth factor receptor 2 (HER2) are overexpression in breast cancer cell, but not in normal cells. They are associated with the progression of breast cancer. Therefore, they could be used as cancer markers of antibodies targeting therapy. Anti-CEACAM6 and anti-HER-2 single domain antibodies (sdAb) were cloned from heavy chain only IgG of an immunized llama immune library and fused with Fc fragment. A breast cancer cell line, MCF-7, was used to test the therapy efficiency, and conventional chemotherapy drug, docetaxel, was used as a control of the experiment. Our data indicated that anti-CEACAM6 and anti-HER-2 sdAb could

reduce breast cancer cell proliferation and induced tumor cell apoptosis. Western blotting indicated anti-CEACAM6 and anti-HER-2 could induced caspase-9 activation, and PARP cleavage; reduced MCF-7 secreted MMP-2, MMP-9 activity; inhibited MCP-1, ICAM-1, and VCAM-1 expression. In other words, anti-CEACAM6 and anti-HER-2 sdAb could inhibit breast cancer progression by reduce breast cancer cell migration, invasion, monocytes infiltration, and angiogenesis. Therefore, anti-CEACAM6 and anti-HER-2 sdAb are ideal candidates for the breast cancer with CEACAM-6 and HER-2 overexpression.

Conclusion, Growth hormone receptor, CEACAM6, and Her-2 are idea target markers for non-small cell lung cancer and breast cancer targeting therapy.



## 誌謝

新竹，一開始是個沒有味道的城市，但在南大路與西大路口的第一張沒有待轉格卻未待轉來著的紅單，以及機車被拖吊到大停車場……種種可說是埋下了“瘋城”與我的“孽”緣。

心中的小叛逆引領我進入到與原先領域相差甚遠的生物物理實驗室，還好有靖淳學姐、瑤貞學姐、芳馨學姐以及子正學長給我上了實驗室“入門”課程，暑假常麻煩子歡與明勳當我的地圖，曾博的“吼~我真的要準備一支電極棒了哦!”也滿有效果的，更要大大感謝我的指導教授 張家靖 博士，對於我這個物理不太行的學生多加包容，並耐心的指導，以及給予我至 Anaheim 參與國際會議的機會，是我人生中滿精彩的一段學習與回憶。

雖然後半年被寫論文這件事搞得有點精神不正常，哈!不過實驗室的大家真是大好人，每天跟我一起胡言亂語，到底是誰在寫論文啊?哈!。初進實驗室時“這個實驗室好怪…鄭博跟學亮學長好恐怖，像流氓…”，不過感謝爸爸要他當斯文人的 鄭財木 博士，在物理實驗室裡您與學亮真是讓我備感親切，教了我非常多的技術與知識，超感謝您~我一定不會跟別人講你取嫩妻的!還有阿娟不喜歡底迪，快放她去交男朋友啦!學亮不要再一天到晚說自己實驗亂做，根本在聲東擊西吼!哪天發了 PNAS 記得提拔我，謝謝!還要祝你們家的琪琪美女、嘟嘟、彎彎與未來更多小學亮平安快樂，健康順心!每天照顧我們一群小毛頭的憲儀姐~常開車帶我們趴趴走，我不會忘記妳跟妳家超可愛胖迪、悅悅與小藍馬5的!畢業後 MSN 和 FB 沒事也會開著跟您繼續網拍!啊~李醫師，我們只是討論而已，沒有要買哦~哈!謝謝星原學長讓我當了幾天的台大醫院新竹分院研究助理。謝謝輔宣學長這個物理老人，常講一堆我聽不懂的@#%&\*，但您真的很有耐心耶!不過說實在，女朋友勒!!您該更新一下追美湄的招數了吧…。

常常一天跟我在一起最多時間的娟姐，我必須說，美國行有妳真好，雖然蠢到爆~哈哈!畢業了八卦還是要常常 update 嘿!偉賢同學，謝謝你在電腦啦~軟體啦~等等的幫助，真的!賺錢固然重要，身體也要顧哦~哈!昌翰同學，自彈自唱的天天想妳都過這麼久了，祝你跟你的雙魚女孩可以開花結果，改天帶來一起聚餐囉!小象邦邦，你搞笑歸搞笑，不要再迷路了~你要自立自強啊!至少 google map 看一看要認真記阿…。還要感謝趙老師與趙老師實驗室的光凱學長、惠芳學姐實驗上的指導，趙家同學、學弟妹的照顧，讓我的細胞實驗能順利進行。感謝同步輻射中心 胡宇光 博士願意出借共軛焦顯微鏡。

最後，謝謝鼓勵我到交大唸書的爸媽，有你們讓我求學過程一路順利，不需擔心生活上的問題，並且給予我精神上的支持。也謝謝健銘、波克、一百、大大……等大學好友，一起努力度過這兩年。大學的指導教授 黃建富 博士，即使我們畢業、離開實驗室，但對我們的關心與照顧絲毫未減，謝謝您!還有丹瑜，不管妳未來的規畫如何，我永遠支持。於此，感謝更多關心我的人。Ya~我畢業囉:)

## 目錄

中文摘要.....	I
Abstract.....	III
誌謝.....	V
目錄.....	VI
表目錄.....	XI
圖目錄.....	XII
縮寫表.....	XIV
序論.....	1
1 癌症發生與特性.....	1
2 癌症的治療.....	1
3 細胞死亡與其分子機制.....	2
4 實驗動機.....	6
壹、    多光子趨動標靶化奈米鑽石誘發癌細胞死亡之機制.....	7
壹、第一章 研究背景.....	8
壹-1-1 肺癌.....	8
壹-1-2 奈米材料於生物醫學之應用.....	8
壹-1-3 多光子效應 (multiphoton effect).....	10
壹、第二章 研究動機與策略.....	11
壹-2-1 研究動機.....	11
壹、第三章 實驗策略原理.....	13
壹-3-1 蛋白質的表現與純化.....	13
壹-3-2 EDC、sulfo-NHS 的蛋白質接合.....	13
壹-3-3 原子力顯微鏡 (Atomic force microscopy, AFM).....	14
壹-3-4 動態光散射儀 (Dynamic light scattering, DLS).....	14
壹-3-5 螢光儀 (Fluorescence spectrometer).....	14
壹-3-6 奈秒脈衝雷射 (Nano-second pulse laser).....	15
壹-3-7 拉曼光譜 (Raman spectrum).....	15
壹-3-8 蛋白質定量法.....	16
壹-3-8-1 Bradford dye-binding method.....	16
壹-3-8-2 紫外光吸收法 (UV absorption).....	16
壹-3-9 十二烷基硫酸鈉聚丙烯醯胺凝膠電泳 (SDS-PAGE).....	16
壹-3-10 西方墨點法 (Western blot).....	17
壹-3-11 錐蟲藍排除法 (Trypan blue exclusion).....	17
壹-3-12 MTT.....	17
壹-3-13 螢光顯微鏡 (Fluorescence microscopy).....	18

壹-3-14 共軛焦顯微鏡 (Confocal microscopy).....	19
壹-3-15 免疫細胞染色 (Immunocytochemistry).....	20
壹-3-16 酵素連結免疫吸附法 (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) .....	20
壹、第四章 實驗材料與方法.....	21
壹-4-1 實驗材料.....	21
壹-4-1-1 細胞株來源.....	21
壹-4-2 實驗方法與步驟.....	21
壹-4-2-1 蛋白質之表現與純化.....	21
壹-4-2-2 5 nm 羧酸化奈米鑽石之螢光 3D 全光譜分析.....	22
壹-4-2-3 羧酸化奈米鑽石表面接合生物分子.....	22
壹-4-2-4 以動態光散射儀分析 cND-GHRBP-GFP 複合體之平均粒徑大小 .....	23
壹-4-2-5 以原子力顯微鏡分析 cND-GHRBP-GFP 複合體之外型與均勻程 度.....	23
壹-4-2-6 GHRBP 之抗體製備.....	23
壹-4-2-7 細胞培養.....	24
壹-4-2-8 利用倒立式螢光顯微鏡觀察 cND-GHRBP-GFP 複合體表現之螢 光與奈米鑽石之位置.....	25
壹-4-2-9 觀察 cND-GHRBP-GFP 複合體於細胞內之位置.....	26
壹-4-2-10 以錐蟲藍細胞染色觀察細胞死亡情形.....	26
壹-4-2-11 利用細胞化學免液染色觀察細胞凋亡與細胞壞死相關蛋白.....	26
壹、第五章 實驗結果.....	28
壹-5-1 重組生長激素受體結合蛋白質表現與純化.....	28
壹-5-2 5 nm 羧酸化奈米鑽石 3D 螢光光譜.....	30
壹-5-3 5 nm cND、GHRBP 以及 pET30a-Eam-GFP 之細胞毒性測試.....	31
壹-5-4 cND-GHRBP-GFP 複合體粒徑大小、構形分析，以及細胞毒性測試 .....	33
壹-5-5 GHRBP 抗體的取得與效價分析.....	37
壹-5-6 羧酸化奈米鑽石-生長激素-綠螢光蛋白複合體表現於 A549 細胞膜.....	39
壹-5-7 分別選定 5 mJ 與 30 mJ 作為 266 nm 以及 532 nm 奈秒脈衝雷射於癌 細胞與 cND-GHRBP-GFP 之作用功率.....	40
壹-5-8 A549 肺腺癌細胞分別經由 266 nm 以及 532 nm 雷射激發後之細胞型 態觀察與存活率分析.....	43
壹-5-9 cND-GHRBP-GFP 複合體經由雷射激發後對於大量表現生長激素受 體之 A549 肺腺癌細胞選擇性抑制細胞增殖能力.....	46
壹-5-10 分別以 266 nm 與 532 nm 雷射激發後觀察 A549 細胞中細胞發炎因 子 COX-2 之表現.....	48

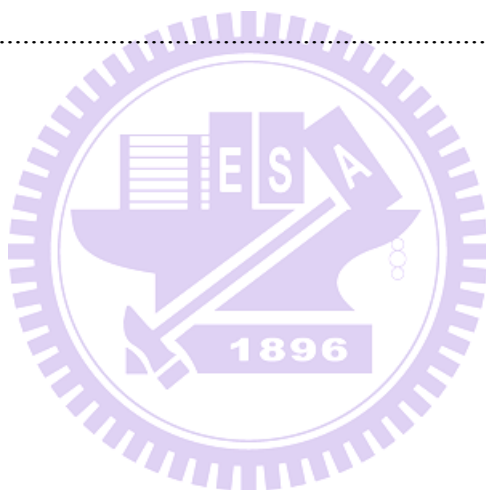


壹-5-11 以 266 nm 與 532 nm 雷射激發後觀察 A549 細胞中 caspase-3 之表現	52
壹-5-12 以 266 nm、532 nm 雷射激發後觀察 A549 細胞中細胞凋亡誘導因子 AIF 之表現	56
壹-5-13 大量表現生長激素受體之細胞株	60
壹、第六章 討論	61
壹-6-1 cND-GHRBP-GFP 複合體之定量與特性分析	61
壹-2 多光子效應對奈米鑽石與細胞之影響	62
壹-6-3 cND-GHRBP-GFP 複合體經由雷射激發後，造成癌細胞損壞與死亡之可能路徑	63
壹-6-4 接合癌症標靶因子之奈米鑽石日後可能之應用	64
貳、anti-CEACAM6 與 anti-HER-2 單一抗原結合功能區抗體於乳癌標靶治療之研究	65
貳、第一章 研究背景	66
貳-1-1 乳癌背景	66
貳-1-2 乳癌之進程	66
貳-1-2-1 細胞不正常增生	66
貳-1-2-2 巨噬細胞浸潤癌症細胞	66
貳-1-2-3 癌細胞侵犯組織	67
貳-1-2-4 血管新生	67
貳-1-2-5 癌細胞轉移	68
貳-1-3 目前乳癌之治療	68
貳-1-4 人類上皮生長因子受體 2	69
貳-1-5 癌胚抗原相關黏著分子 6	69
貳-1-6 簡介單一抗原結合功能區抗體(single-domain antibody, sdAb)	70
貳-1-7 單一抗原結合功能區抗體應用於 CEACAM6 表現相關之癌症治療現況	71
貳、第二章 研究動機與策略	72
貳-2-1 研究動機	72
貳-2-2 研究策略	73
貳-2-2 研究策略貳、第三章 實驗原理	73
貳、第三章 實驗原理	74
貳-3-1 蛋白質的表現與純化	74
貳-3-2 明膠蛋白酵素電泳法 (Gelatin zymography)	74
貳-3-3 十二烷基硫酸鈉聚丙烯醯胺凝膠電泳 (SDS-PAGE)	75
貳-3-4 西方墨點法 (western blot)	75
貳-3-5 錐蟲藍排除法 (trypan blue exclusion)	75
貳-3-6 MTT	75

貳-3-7 Calcein AM 染色法 .....	75
貳-3-8 免疫細胞化學染色 (immunocytochemistry) .....	76
貳-3-9 螢光顯微鏡 (fluorescence microscopy) .....	76
貳-3-10 Annexin V/PI assay .....	76
貳-3-11 流式細胞儀 (flow cytometer) .....	77
貳、第四章 實驗材料與方法 .....	79
貳-4-1 實驗材料 .....	79
貳-4-1-1 細胞株來源 .....	79
貳-4-2 實驗方法 .....	79
貳-4-2-1 蛋白質之表現與純化 .....	79
貳-4-2-2 細胞培養 .....	80
貳-4-2-3 細胞活性分析 .....	80
貳-4-2-4 藉由免疫細胞化學染色偵測 CEACAM6 與 HER-2 於細胞內之表現 .....	80
貳-4-2-5 基質金屬蛋白酶活性分析 .....	81
貳-4-2-6 單核細胞趨化蛋白表現分析 .....	81
貳-4-2-7 細胞浸潤能力分析 .....	82
貳-4-2-8 細胞基質侵蝕力分析 .....	83
貳-4-2-9 血管新生能力測試 .....	84
貳-4-2-10 利用西方墨點法偵測細胞訊息傳遞及凋亡蛋白之表現 .....	85
貳-4-2-11 利用 Annexin V/PI 雙染色並以流式細胞儀進行細胞凋亡分析 .....	86
貳、第五章 實驗結果 .....	87
貳-5-1 sdAb 與 HCAb 抗體表現與純化 .....	87
貳-5-2 HER-2 與 CEACAM6 蛋白質表現於 MCF-7 與 THP-1 細胞中 .....	88
貳-5-3 anti-HER-2 抗體與 anti-CEACAM6 抗體抑制 MCF-7 細胞的增生及基質金屬蛋白酶的活性 .....	91
貳-5-4 單一抗原結合功能區抗體誘導乳癌細胞 MCF-7 死亡之分析 .....	92
貳-5-6 anti-CEACAM6 抗體依濃度依賴性抑制單核球細胞趨化蛋白之表現 .....	97
貳-5-7 anti-CEACAM6 抗體與 anti-HER-2 抗體降低細胞黏附因子 ICAM-1 以及 VCAM-1 之表現 .....	98
貳-5-8 anti-CEACAM6 抗體與 anti-HER-2 抗體抑制免疫球細胞 THP-1 對乳癌細胞 MCF-7 的浸潤作用 .....	99
貳-5-9 anti-CEACAM6 抗體與 anti-HER-2 抗體抑制 MCF-7 的侵犯作用 .....	101
貳-5-10 anti-CEACAM6 抗體與 anti-HER-2 抗體降低 MCF-7 所誘發的 HUVECs 血管新生作用 .....	103



貳-5-11 單一抗原結合功能區抗體誘導細胞凋亡相關蛋白之表現.....	105
貳、第六章 討論.....	106
貳-6-1 單一抗原結合功能區抗體之優點.....	106
貳-6-2 單一抗原結合功能區抗體透過細胞凋亡路徑抑制乳癌細胞之增生 .....	106
貳-6-3 單一抗原結合功能區抗體抑制乳癌細胞中基質金屬蛋白酶 MMP-2、 MMP-9 活性.....	106
貳-6-4 單一抗原結合功能區抗體抑制 THP-1 細胞浸潤乳癌細胞之作用..	107
貳-6-5 單一抗原結合功能區抗體抑制 MCF-7 乳癌細胞之侵犯與轉移.....	108
貳-6-6 單一抗原結合功能區抗體抑制乳癌之血管新生能力.....	108
貳-6-7 anti-HER-2 單一抗原結合功能區抗體與 Herceptin 於乳癌治療之差異 .....	109
貳-6-8 單一抗原結合功能區抗體之應用.....	109
結論.....	111
參考資料.....	112



## 表目錄

表一、細胞凋亡與細胞壞死的型態學差異.....	3
表二、蛋白質變性之緩衝溶液內含成分.....	21
表三、蛋白質摺疊過程各步驟之摺疊緩衝溶液內含成分.....	22
表四、不同波長激發後奈米鑽石之 diamond band 與 G band 拉曼光譜比率 .....	42



## 圖目錄

圖 1、細胞死亡之分子機制.....	6
圖 2、MTT 於細胞內之作用機制.....	18
圖 3、螢光能階圖.....	18
圖 4、倒立螢光顯微鏡光路圖.....	19
圖 5、利用 EDC 與 sulfo-NHS 接合 cND、rEaGH 及 GFP.....	23
圖 6、pET28a-GH 以 IPTG 誘導大量表現後之 SDS-PAGE.....	28
圖 7、pET30a-Eam-GFP 以 IPTG 誘導大量表現後之 SDS-PAGE.....	29
圖 8、pET30a-Eam-GFP 以 His-tag 管柱純化後之 SDS-PAGE.....	29
圖 9、以螢光儀觀察 5 nm 羧酸化奈米鑽石之 3D 螢光光譜圖.....	30
圖 10、利用 MTT 分別分析 cND、GHRBP、pET30a-Eam-GFP 對 A549 細胞之細胞毒性。.....	32
圖 11、以原子力顯微鏡觀察 cND-GHRBP-GFP 複合體.....	34
圖 12、以動態光散射儀量測 cND-GHRBP-GFP 複合體之平均粒徑大小.....	35
圖 13、利用螢光儀觀察 cND-GHRBP-GFP 複合體之螢光光譜圖.....	35
圖 14、以螢光顯微鏡觀察 cND-GHRBP-GFP 複合體.....	36
圖 15、利用 MTT 分析 cND-GHRBP-GFP 於 A549 細胞中之細胞毒性.....	36
圖 16、mouse anti-rEAGH 抗體效價測試結果.....	37
圖 17、以西方墨點法測試 mouse anti-rEAGH 抗體於不同之細胞株以及純 BSA 與 rEaGH 蛋白質之專一性.....	38
圖 18、cND-GHRBP-GFP 複合體於細胞內之共軛焦顯微鏡影像.....	39
圖 19、經由 266 nm 雷射以 0.1 s/step 激發奈米鑽石之拉曼光譜圖.....	41
圖 20、經由 532 nm 雷射以 10 s/step 激發奈米鑽石之拉曼光譜圖.....	42
圖 21、A549 細胞經由處理 cND-GHRBP-GFP 複合體與雷射激發後之顯微明視野影像.....	44
圖 22、細胞處理 cND-GHRBP-GFP 與雷射激發後之活性分析.....	45
圖 23、以西方墨點法分析肺癌細胞株 A549 與正常肺細胞株 HFL-1 內之生長激素受體表現.....	47
圖 24、以 cND-GFRBP-GFP 複合體處理細胞以及 532 nm 雷射誘導後細胞存活率之分析.....	47
圖 25、以 266 nm 與 532 nm 雷射激發及歐洲紫杉醇處理後，A549 細胞中細胞發炎因子 COX-2 之表現.....	51
圖 26、266 nm 與 532 nm 雷射激發及歐洲紫杉醇處理後，A549 細胞中細胞凋亡蛋白質 caspase-3 之表現.....	55
圖 27、以 266 nm 與 532 nm 雷射激發及歐洲紫杉醇處理後，A549 細胞中細胞凋亡誘導因子 AIF 之表現.....	59

圖 28、不同癌症細胞株內之生長激素受體表現.....	60
圖 29、原子力顯微鏡掃描示意圖.....	62
圖 30、癌症進程示意圖.....	68
圖 31、sdAb 與 HCAb 抗體之構築與結構示意圖.....	71
圖 32、構築單一抗原結合功能區抗體之 DNA 片段於 pSJF2 載體中之策略簡圖 .....	74
圖 33、Calcein AM 細胞染色法示意圖.....	76
圖 34、Annexin V/PI 細胞雙染色法原理示意圖.....	77
圖 35、流式細胞儀示意圖.....	78
圖 36、單核球細胞浸潤乳癌能力分析實驗流程圖.....	83
圖 37、乳癌細胞侵蝕細胞基質能力分析實驗流程圖.....	84
圖 38、上皮細胞血管新生能力分析實驗流程圖.....	85
圖 39、2A3 與 2A3-Fc 抗體之表現.....	87
圖 40、觀察 MCF-7、THP-1 和 HUVEC 三種細胞株內之 HER-2 與 CEACAM6 表現.....	90
圖 41、細胞內 sdAb 2A3 與 HCAb 2A3-Fc 抑制細胞增生能力之分析.....	91
圖 42、以 Annexin V/PI 分析經由 sdAb 與 HCAb 處理 72 小時後之乳癌細胞 MCF-7 .....	94
圖 43、sdAb 2A3 與 HCAb 2A3-Fc 抑制細胞內之 MMP-2 與 MMP-9 之活性分析 .....	96
圖 44、HCAb 2A3-Fc 抑制細胞內 MCP-1 表現量之分析.....	97
圖 45、sdAb 與 HCAb 處理 MCF-7 細胞後細胞分泌之細胞黏附因子表現量分析 .....	98
圖 46、分析經由 sdAb、HCAb 處理後，免疫球細胞 THP-1 對 MCF-7 之浸潤作 用.....	100
圖 47、分析經由 sdAb、HCAb 處理後，乳癌細胞 MCF-7 之侵犯作用.....	102
圖 48、分析經由 sdAb、HCAb 處理後，乳癌細胞 MCF-7 與周邊上皮細胞 HUVECs 之血管新生作用.....	104
圖 49、sdAb 與 HCAb 處理 MCF-7 細胞後細胞內之細胞凋亡相關蛋白質表現量 分析.....	105

## 縮寫表

Abbreviation	All written
AFM	atomic force microscopy
AIF	apoptosis-inducing factor
Amp II	amphiphysin II
Apaf-1	apoptotic protease activating factor 1
Arf	ADP-ribosylation factor
ATR/Chk1	ataxia telangiectasia and Rad3-related check point kinase-1
Bax	BCL2-associated X protein
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BCRC	Bioresource Collection and Research Center
$\beta$ -ME	beta-Mercaptoethanol
BSA	bovine serum albumin
caspase	cysteine aspartate protease
CBG250	coomassie brilliant blue G-250
CD66c	cluster of differentiation 66c
CEA	carcinoembryonic antigen
CEACAM6	carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CH1	constant domain 1
CMV	cytomegalovirus
CNT	carbon nanotube
Cox-2	cyclooxygenase-2
CSF-1	colony-stimulating factor 1
Cyto C	cytochrome c
dATP	deoxyadenosine triphosphate
DED	death effector domain
DLS	dynamic light scattering
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	dimethyl sulfoxide
DTT	dithiothreitol
DIABLO	direct IAP-binding protein with low pI
DISC	death-inducing signaling complex
ECGS	endothelial cell growth supplement
ECM	extracellular matrix components

---

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDC	1-ethyl-3- [ 3-dimethylaminopropyl ] carbodiimide hydrochloride
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EGF	epidermal growth factor
EGFR	epidermal growth factor receptor
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ER	endoplasmic reticulum
ER	estrogen receptor
ERK	extracellular signal-regulated kinase
FADD	Fas-associated death domain
FLICE	procaspase-8/FADD-like interleukin 1-converting enzyme
FSC	forward scatter
GEF100	guanine nucleotide exchange factor 100
GPI	glycosylphosphatidylinositol
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	hydrogen peroxide
HCAb	heavy chain antibody
HER-2	human epidermal growth factor receptor 2
His-Tag	histidine tag
HRP	horseradish peroxidase
HUVECs	human umbilical vein endothelial cells
IDC	invasive ductal carcinoma
IPTG	isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside
JNK	c-jun N-terminal kinases
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MCP-1	monocyte chemoattractant protein-1
MEFs	murine embryonic fibroblasts
MMPs	matrix metalloproteases
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NCHS	National Center for Health Statistics
Nd:Y <sub>3</sub> Al <sub>5</sub> O <sub>12</sub>	neodymium-doped yttrium aluminium garnet
NF-κB	nuclear factor <i>kappa</i> -light-chain-enhancer of activated <i>B</i> cells
NV center	nitrogen-vacancy defect center
Orip	origin of replication
PA	polyadenylation
PARP	poly ADP-ribose polymerase
PBS	phosphate buffered saline
pCMV	cytomegalovirus promoter
PCS	photon correlation spectroscopy

---

---

PDGF	platelet-derived growth factor
PDA	pancreatic ductal adenocarcinoma
PEI	polyethylenimine
PI	propidium iodide
PR	progesterone receptor
pro-A-SMase	pro-acid sphingomyelinase
pro-pre-CAM	pro-pre-cathepsin D
PS	phosphatidylserine
PSPD	position sensitive photo-diode
PVDF	polyvinylidene difluoride
RANTES	regulated upon activation, normal T-cell expressed, and secreted
RIP1	ubiquinol-cytochrome c reductase, Rieske iron-sulfur polypeptide 1
RNAi	RNA interference
sdAb	single domain antibody
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis gel
SH2	srcoma homdogy 2, src homology 2
Sulfo-NHS	N-hydroxysulfosuccinimide sodium salt
TAM	tumor-associated macrophage
TEM	transmission electron microscopy
TIMPs	tissue inhibitor of metalloproteinases
TNF- $\alpha$	tumor necrosis factor $\alpha$
TNFR	tumor necrosis factor receptor
TNF-R1	tumor necrosis factor receptor superfamily member 1a
TNT	trinitrotoluene
TPL	adenovirus tripartite leader
TRADD	tumor necrosis factor receptor – associated death domain
TRAF2	TNF receptor –associated factor 2
Smac	second mitochondria derived activator of caspase
SSC	side scatter
VEGF	vascular endothelial growth factor
VH	variable domain
VHH	VH of heavy chain
WHO	World Health Organization

---



## 序論

### 1 癌症發生與特性

根據衛生署公佈資料，民國九十九年的十大死因，癌症仍然高居第一位，並且已經連續二十九年佔踞十大死因首位，根據統計，大約每十二分四十八秒就有一人死於癌症[1]。導致癌症的原因有很多，其中包括了環境汙染[2]、吸煙[3]、病毒感染[2]、遺傳[4]與賀爾蒙[5-7]等多種原因，但在所有的癌症細胞中都有一個共通性，即是癌症細胞的基因訊息均有突變，造成了癌細胞不會受到正常生理限制調控且可繼續生長[8-10]。與正常細胞相較之下，癌細胞擁以下特性: a.無細胞分裂次數限制[8, 10] b.可自體分泌生長因子 (Autocrine) [11-13] c.不受細胞凋亡機制 (apoptosis)的調控[14-16] d.不受細胞間接觸抑制 (contact inhibition)[17-19] e.有轉移至其他組織的能力[20, 21] f.具有促使血管新生 (angiogenesis)的能力[22-24]。面對癌症細胞的多變性極高死亡率，目前常使用的治療方法可分為傳統的手術與化療，以及結合生物技術的療法，包括標靶治療與免疫療法等等。

### 2 癌症的治療

#### 2-1 傳統療法

較常見的傳統療法包括外科切除、放射線療法、及化學藥物療法。

##### 2-1-1 外科切除

當癌症初期，癌細胞尚未轉移時，可進行外科切除癌症病變的區域，如果手術進行順利並且將病灶部位切除乾淨的話，是可以完全將癌症治癒的。目前較著名的例子為治療乳癌的乳房切除術 (mastectomy)[25, 26] 與治療前列腺癌的前列腺切除術 (prostatectomy)[27]。但是因為在病灶附近可能會有些許肉眼無法辨識的癌細胞存在，導致手術後仍殘存癌症復發的風險。除此之外，並非每個部位的癌症均適合使用手術治療，例如淋巴瘤等。而當癌細胞擴散後，手術即無法成為單一或是主要的治療方式[27-30]。

##### 2-1-2 放射線療法

放射線療法利用對人體具有傷害性的放射線，依據癌細胞生長快速的特性，所設計出來的一種療法。因癌細胞生長與分裂速率較正常細胞快速，故遭到放射線攻擊細胞內的去氧核糖核酸 (deoxyribonucleic acid, DNA)，使所受到的傷害也會較大，放射性療法的好處是可控制放射線侷限於需治療之部位。放射線療法可應用之範圍廣泛，包括乳房肺臟、胰臟、皮膚等固態瘤 (solid tumor)或是淋巴瘤、血癌等均可使用。不過，在進行高劑量的放射線治療時，仍有機會對週遭正常細胞產生傷害，並產生治療的副作用[31-33]。

##### 2-1-3 化學藥物療法

利用干擾細胞分裂的藥物阻斷癌細胞的生長，其作用原理與放射線療法相似，大部分的化學藥物均無專一性，會對其他細胞造成影響，故除了最基本的對藥物產生過敏外，常見的副作用還有消化系統的潰瘍、噁心、嘔吐、及造成白血球、紅血球、血小板

數量降低等，常會造成癌症病人卻步[34-36]。

## 2-2 新興療法

有鑑於傳統療法常伴隨嚴重副作用，導致病人醫療意願以及醫療效果下降，新興的癌症治療方式可以專一性的攻擊癌細胞，且不影響正常細胞。目前此類療法包括了免疫療法、光敏療法、標靶藥物療法。

### 2-2-1 免疫療法

人體中的淋巴球除了 T 細胞與 B 細胞外，另外有大約 15%~20%的天然殺手細胞 (natural killer cell, NK cell)。天然殺手細胞與 T 細胞與最大的不同點在於天然殺手細胞不需要巨噬細胞所呈現的表面抗原，即可快速的攻擊癌細胞，且目前天然殺手細胞的來源為來自病人體內，經過體外培養使細胞增多後在注射進患者體內，故並不會有排斥反應的問題產生[37-40]。目前日本已有數十例成功的案例，其中包括乳癌、肺癌等[41, 42]。

### 2-2-3 光敏療法

光敏療法又稱為光動力學療法、光化學療法等。其原理為將光敏劑注入體內，在輔以雷射以特殊波長激發光敏劑，產生一系列反應，使得與光敏劑接合的分子被破壞，在癌症治療中，目前常使用的光敏劑為血卟啉衍生物 (HPD)，此衍生物對腫瘤細胞有較強的親和力，故對腫瘤細胞有較大的傷害。相較於腫瘤細胞，光敏劑在正常組織中停留的時間較短，不容易產生副作用。惜一般在注射光敏劑後，患者需避光一~二月，避免非預期的副作用產生[43-45]。

### 2-2-2 標靶治療

標靶治療的原理為阻斷癌細胞特有的分子機制來達到殺死癌細胞的目的。其作用目標主要針對癌細胞訊息傳導、血管新生的機轉及特定表面抗原，藉由藥物或是單株抗體 [46-50] 結合並阻斷癌細胞特有的表面抗原與特定的分子機制，達到抑制癌細胞生長、導致癌細胞細胞凋亡及抑制癌細胞侵蝕能力的效果。其優點是對癌細胞有專一性，並不影響週遭的正常細胞，也不容易產生嚴重的副作用。但因為癌細胞的多變性，導致每位患者身上的癌細胞在基因突變的位置也不盡相同，故標靶治療藥物並非適合每一位癌症患者，在進行標靶藥物治療前，必須先進行基因檢測及評估，以期取得較佳的治療效果。

不論是傳統療法或是新興療法，均希望對癌細胞造成較大的傷害，並且對於週遭的正常細胞產生較小的影響，所以對於每次治療的放射線或是藥物的劑量都必須精準計算，以期癌細胞藉由細胞凋亡途徑死亡，並避免高劑量的放射線或是藥物導致癌細胞與週遭正常細胞產生壞死 (necrosis) 的情形，進而引起免疫反應並導致附近細胞及組織受損[51-57]。

## 3 細胞死亡與其分子機制

細胞死亡的路徑主要可以區分為細胞凋亡與細胞壞死(圖 1)，細胞凋亡主要指的是主動的、有計畫性的細胞死亡途徑，並且可以避免非預期性的發炎反應 (inflammation) 產生[58-62];而細胞壞死主要被歸類為被動的，被環境影響的非計畫性死亡，並會釋放細胞內的發炎物質導致發炎反應的產生[63-66]。換句話說，當細胞受損而進行細胞凋亡

時，並不會對附近的細胞或組織產生不良的影響，而細胞壞死則會對附近的細胞或組織產生不良的影響，進而導致其受損。除了生理影響上的區別外，一般判斷細胞凋亡與壞死的方式，主要是尤其外觀上的不同(表一)及其分子機制的差異進行判斷。

表一、細胞凋亡與細胞壞死的型態學差異

	細胞凋亡	細胞壞死
型態變化	細胞皺縮，胞器完整	細胞腫脹 (cell swelling)，結構被破壞
細胞核	濃縮 (nuclear condensation)	細胞核腫脹
染色體	聚集，緻密	鬆散，分散
細胞形狀	呈現凋亡小體 (apoptotic body)	細胞破碎

參考文獻[61-65, 67, 68]

### 3-1 細胞壞死與其分子機制

細胞壞死被稱為一個非計畫性的細胞死亡模式，在此情況下，細胞會迅速膨脹，細胞膜破裂，細胞內的物質會被釋放出來。導致離子平衡、溶小體內容物被釋放，在這種情形下，細胞本身無法承擔死亡所帶來的後果，而進一步造成細胞毒性並釋放發炎因子影響到附近的細胞與組織[67, 68]。在病理上，細胞壞死常與缺血、中風及神經退化性疾病有關[69-71]。然而，最近的研究指出，細胞其實可以控制是否走向壞死路徑[72-75]，也就是說，除了無法預期的傷害外，細胞其實也可以選擇是否走向壞死路徑。其原因可能是當其他細胞死亡路徑被抑制，細胞又需要死亡時，細胞可能會選擇以壞死路徑造成細胞死亡[76, 77]。但是因為其造成的發炎反應及對週遭細胞或組織的傷害，所以通常是被放在較後面的選擇順位，此外，在演化上，越高等的生物會有更多的自噬 (autophagy) 與細胞凋亡機制可代替壞死機制[75, 78]。事實上，當使用藥物毒殺細胞時，常會發現細胞凋亡與細胞壞死共同產生的情形[79]，此結果也反映出了無法使用簡單的方式檢測並量化細胞壞死的程度[80]。

在分子機制方面，當死亡受體 (death receptors) 接受到訊息後，會聚集並啟動訊息傳導路徑，依照不同的細胞，造成細胞凋亡或細胞壞死[81]。腫瘤壞死因子  $\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )，可誘導多種細胞凋亡，但在 L929 小鼠纖維肉瘤細胞株內，腫瘤壞死因子  $\alpha$  可誘導細胞壞死[82]，其作用機轉主要是改變細胞膜的通透性且失去脫氫酶 (dehydrogenase) 的活性，並誘導腫瘤壞死因子-細胞激素 5 (cytokine 5) 的產生[83]，另外，加入泛硫胱氨酸蛋白酶 (cysteine aspartate protease, caspase) 抑制劑 zVAD-FMK 可增強腫瘤壞死因子  $\alpha$  所誘導的細胞壞死[84]，此外，在小鼠胚胎纖維母細胞 (murine embryonic fibroblasts, MEFs) 中，加入泛硫胱氨酸蛋白酶抑制劑可將腫瘤壞死因子  $\alpha$  所誘導的細胞凋亡途徑改變為細胞壞死途徑[85]，此結論也可呼應細胞壞死路徑可當作細胞凋亡路徑被阻斷時的替代路徑。Fas 相關死亡區域 (Fas-associated death domain, FADD)，是決定細胞走向細胞凋亡或是細胞壞死的關鍵開關[86, 87]，在細胞壞死路徑中，當腫瘤壞死因子  $\alpha$  與腫瘤壞死因子受器超級家族 1a (tumor necrosis factor receptor superfamily member



1a, TNF-R1)結合後，並不會造成更多的 Fas 相關死亡區域與受器結合[88-90]，並且迅速的在質膜 (plasma membrane)形成含有腫瘤壞死因子受器超級家族 1a、腫瘤壞死因子受器相關因子 2 (TNF receptor-associated factor 2, TRAF2)與 RIP1 (ubiquinol-cytochrome c reductase, Rieske iron-sulfur polypeptide 1)之複合體[91]，迅速活化 NF- $\kappa$ B (nuclear factor  $\kappa$ -light-chain-enhancer of activated B cells)與有絲分裂原活化蛋白激酶

(mitogen-activated protein kinases, MAPKs) [92]，例如 p38 有絲分裂原活化蛋白激酶 (p38 mitogen-activated protein kinase, p38 MAPK)、c-jun N 端激酶 (c-jun N-terminal kinases, JNK)與細胞外訊息調節激酶 (Extracellular signal-regulated kinases, ERK)等 [93]。在腫瘤壞死因子受器超級家族 1a 被細胞內吞 (endocytosis)作用所吞噬後，腫瘤壞死因子受體相關死亡區域蛋白質 (tumor necrosis factor receptor – associated death domain, TRADD) 會與 Fas 相關死亡區域及原硫胱氨酸蛋白酶 8 (procaspase-8, FADD-like interleukin-1-converting enzyme, FLICE)或原硫胱氨酸蛋白酶 10 (procaspase-10)形成第二個複合體[94, 95]，被吞噬進來的囊泡 (vesicle)會與含有原酸性鞘磷脂酶 (pro-acid-sphingomyelinase, pro-A-SMase)及含有原前組織蛋白酶 D (pro-pre-cathepsin D, pro-pre-CAD) 的反式高爾基氏囊泡 (trans-Golgi vesicles)融合，並活化多囊泡核內體 (endosome)內的酸性鞘磷脂酶與組織蛋白酶 D [96, 97]。如果第一個複合體沒有成功誘導出大量的抗凋亡蛋白 (anti-apoptotic protein)，則細胞會走向凋亡路線。反之，如果有大量的抗凋亡蛋白產生，則細胞會走向壞死路徑[84, 98]。當細胞走向壞死路徑時，一些發炎因子如 TNF- $\alpha$ 、NF $\kappa$ B、COX-2 等會被誘發表現並對周圍細胞產生傷害[99, 100]。

### 3-2 細胞凋亡及其分子機制

細胞凋亡，或稱程序性細胞死亡 (programmed cell death)，此現象首先於線蟲 (*Caenorhabditis elegans*, *C. elegans*)中被發現[101]，成熟的線蟲有1090個體細胞，其中有131個體細胞會於發育過程中經由細胞凋亡方式死亡，在不同的個體中，這131個體細胞死亡的時機與方式是一模一樣的，代表其中有個嚴謹且精準的機制調控細胞死亡，且不影響其他細胞的正常生長發育[101]。細胞凋亡在生長以及維持體內平衡扮演重要的角色，且常伴隨者發育或衰老過程[102-107]，維持細胞組織內的平衡，或是在免疫反應或細胞受損時，扮演防禦者的角色，清除損壞的細胞[108-110]，雖然有多種途徑可誘導細胞凋亡[111-116]，但相同的細胞凋亡誘導物並非對所有的細胞均有相似的效果，例如 Her-2 抗體只對乳癌細胞有效[117]，對其他組織的細胞並不會造成影響。而細胞凋亡主要分為兩種起始途徑，內在 (inner/ intrinsic/ mitochondria)路徑以及外在 (outer/ extrinsic/ receptor) 路徑[118-121]，外在路徑主要是受到一些凋亡訊息所誘導，如 Fas 或腫瘤壞死因子 $\alpha$ ，與細胞膜上的 Fas 或腫瘤壞死因子 $\alpha$ 受器結合後，與受器相連接的 Fas 相關死亡區域會與原硫胱氨酸蛋白酶 8 及原硫胱氨酸蛋白酶 10 的同源區域-死亡效應區域 (death effector domain, DED)結合，形成死亡誘導訊息複合體 (death-inducing signaling complex, DISC)，並自催化 (autocatalytic)及切割原硫胱氨酸蛋白酶 8 或原硫胱氨酸蛋白酶 10，使其成為活化態的硫胱氨酸蛋白酶 8 (active caspase-8)或硫胱氨酸蛋白酶 10 (active caspase-10) [122-124]，活化態的硫胱氨酸蛋白酶 8 或硫胱氨酸蛋白酶 10 會接下來繼續催

化且切割下游的原硫胱氨酸蛋白酶3、6、7[125, 126]，讓細胞走向凋亡路徑。除此之外，活化態的硫胱氨酸蛋白酶也會將屬於細胞淋巴瘤基因2 (B-cell lymphoma 2, Bcl-2)的促細胞凋亡蛋白Bid切割並活化，導致粒線體膜電位改變，啟動細胞凋亡的內在路徑[127-129]。除了外在路徑可以活化細胞凋亡的內在路徑，還有許多的物理或化學傷害(如紫外光[130]等)、抑癌基因以及致癌基因 (c-Myc, c-Fos, p53等)的表現、去氧核糖核酸受損、氧化壓力、錯誤摺疊的蛋白質堆積、以及其他的壓力因子導致內在細胞凋亡路徑的啟動[111, 113, 131]。當路徑啟動時，促細胞凋亡蛋白質細胞淋巴瘤基因2家族成員Bax、Bak、Bim、Bid會被活化[132-134]，或是內質網 (endoplasmic reticulum, ER) 釋放鈣離子，鈣離子隨後會進入粒線體[135-137]，這兩種方式皆會導致粒線体外膜膜電位改變並產生孔洞，造成細胞色素C (cytochrome c)及一些促細胞凋亡分子產生，如第二粒腺體衍生活化硫胱氨酸蛋白酶因子 (second mitochondria derived activator of caspase, Smac)/ 低等電點直接結合細胞凋亡抑制蛋白 (direct IAP-binding protein with low pI, DIABLO)[138, 139]，細胞凋亡誘導因子 (apoptosis-inducing factor, AIF)等[140, 141]。而細胞色素C被釋放至細胞質時，會與凋亡蛋白酶啟動因子1 (apoptotic protease activating factor 1, Apaf-1)、原硫胱氨酸蛋白酶9 (procaspase-9)形成凋亡小體 (apoptosome)[142, 143]，進一步切割與活化硫胱氨酸蛋白酶9，活化的硫胱氨酸蛋白酶9 (active caspase-9)會切割與活化下游的原硫胱氨酸蛋白酶3、6、7 (caspase-3, -6, -7)[144, 145]，並開始細胞凋亡路徑，例如切割修復去氧核糖核酸的多核糖核酸聚合酶 (Poly (ADP-ribose) polymerase, PARP)[146]，水解維持細胞核膜骨架的lamin (class V intermediate filaments)蛋白[147, 148]，使得細胞出現凋亡小體 (apoptotic body)等細胞凋亡型態並死亡。

在本研究中，我們藉由觀察發炎因子之一-環氧酵素2 (cyclooxygenase-2, COX-2)判定細胞是否走向壞死路徑，並以硫胱氨酸蛋白酶3、硫胱氨酸蛋白酶9、多核糖核酸聚合酶[149-151]、細胞凋亡誘導因子等判斷細胞是否走向凋亡途徑。

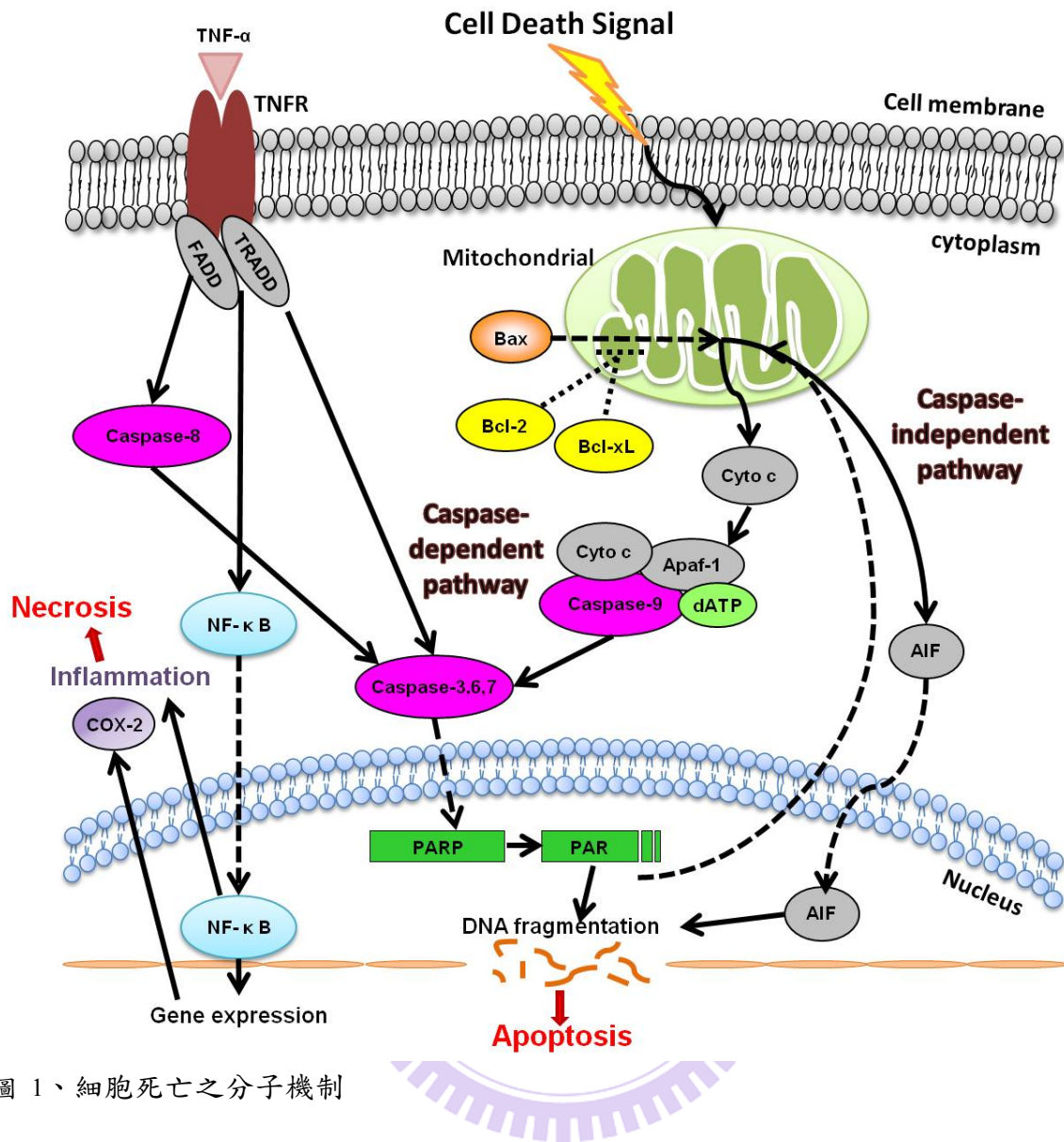


圖 1、細胞死亡之分子機制

#### 4 實驗動機

癌症不容易被完全根治，一般對於癌症治療的效果多以“年存活率”為標的。因為化學藥物與放射性療法為非專一性的治療，所以作用區域並非侷限於病變區域，也容易對於癌細胞週遭組織的損害與引起強烈的副作用，這些結果會降低治療的效果及造成病人的負擔。當癌症復發時，再重覆化學藥物與放射性治療，對於週遭正常細胞的重複性傷害，並不亞於癌症細胞帶來的傷害。目前結合生物科技方式，可將抗癌藥物或是物質傳送至癌細胞，且不會對週遭正常細胞造成影響，此方式即為“標靶治療”。標靶治療作用只針對癌細胞，並可藉由所攜帶的藥物或是物質造成癌細胞以細胞凋亡方式進行死亡，不會造成週遭細胞或組織的傷害，可有效的抑制癌症的增生或使癌細胞減少並達到治療的效果。在本研究中，我們利用結合生長激素的奈米鑽石標定肺癌細胞，並利用雷射激發使奈米鑽石體積爆炸並對癌症細胞造成傷害；或利用可與乳癌細胞特殊表現受體CEACAM6與HER-2結合的單一抗體，達到標靶治療的目的，並藉由探討其死亡分子機制與抑制癌症增生能力，建立新的癌症治療平台與方法。

## 壹、 多光子趨動標靶化奈米鑽石誘發癌細胞死亡之機制





## 壹、第一章 研究背景

### 壹-1-1 肺癌

依世界衛生組織 (World Health Organization, WHO) 歷年公布之世界癌症排名，肺癌 (lung cancer) 之致死率一直列於前三名，於 2010 年之統計資料公佈，無論男性或女性，因肺癌死亡之比率皆佔所有癌症之冠，分別為 29% 以及 26%，而在新增癌症病例中也都位居第二名 [152]。故本研究在篩選了具有生長激素大量表現的癌細胞中，設定以肺癌為研究題材，而肺癌通常又粗分為兩類：小細胞肺腺癌 (small cell lung cancer, SCLC) 與非小細胞肺腺癌 (non small cell lung cancer, NSCLC)。大約 20%-25% 的肺癌患者屬於小細胞肺腺癌，而其他大多數約 75%-80% 則歸類為非小細胞肺腺癌患者 [153, 154]，故本研究選擇以 A549 非小細胞肺腺癌細胞作為主要之研究對象。

### 壹-1-2 奈米材料於生物醫學之應用

「奈 (nano)」為一數量級單位，等於  $10^{-9}$ ，而「奈米 (nanometer)」則為對物質尺度之描述，等於  $10^{-9}$  米。奈米技術於 1990 年代開始受到重視，繼機械、電子、資訊科技後被稱作第四次工業革命，至今已廣泛發展於各領域 [155]，其目的是以原子、分子或巨分子之尺度為基礎 [156]，針對這些物質的結構或裝置作探討及應用，並有別於過往能夠發展出更具功能或效率之目標物。

奈米科技中的一環-奈米材料為科學研究中的熱門題材，舉凡物質之幾何形狀涵蓋於一奈米至三百奈米間 (即達到奈米尺度) 者 [156, 157] 皆可包含於其中，而其主要之類型則包含了奈米粉末或奈米顆粒 (nano powder/ nano particle)、奈米纖維 (nano fiber)、奈米薄膜 (nano film)、奈米塊材 (nano bulk) 等等。奈米粉末或奈米顆粒指的是粒徑大小小於一百奈米以下的粉末或顆粒，為一種介於原子、分子與巨分子間的固體顆粒材料，例如：奈米金、奈米鑽石等；奈米纖維即為三維空間中，有兩個維度處於奈米尺度之線狀材料，亦及直徑或厚度達到奈米尺度並且長度較長之線狀材料；常見如：奈米線、奈米碳管；奈米薄膜係指由奈米尺度之顆粒或晶體所構成之薄膜狀結構，此材料每一層厚度皆於奈米等級的單層膜或多層膜，例如：矽、砷化鎵等，這些材料具有良好之光電特性，多應用於光電、半導體產業；奈米塊材則是將奈米粉末以高壓或高溫之方式使材料成型，通常依此方式所得之奈米材料在特性上會與一般材料有高度特異性，像是具有高比熱、高強度、高導電性、高韌性、高熱膨脹性質等等。而以上這些奈米材料所表現之結構特性更有別於一般，像是尺寸小、具有高表面積與體積比、為高密度堆積之結構，並有高結構組合彈性，這些奈米材料在結構上的特點與優勢造就了其更高的利用價值。

以下列舉一些常見於生醫領域所應用之奈米材料：

(一) 奈米金 (nanogold)：在多種奈米金屬材料中，奈米金粒子因為良好的生物相容性及特殊光學性質，而被研究最為廣泛。目前奈米金粒子應用於生物醫學上的項目包括了光子標靶治療、生物檢測、活體影像觀察等。在光學上，奈米金粒子的特殊吸收波長會因粒徑大小增加而產生紅位移的情形，舉例來說，當奈米金粒子直徑為 3 nm 時，其吸收

波長為 509 nm，而當直徑增加到大約 10 nm 時，其特殊吸收波長則會紅位移至 518 nm 左右，此特殊光學性質較常應用於免疫檢測部分，如驗孕棒等，當分散的奈米金粒子因其上所接合之抗原抗體反應而聚集時，會從原本的淡粉紅色變為深藍色，可供肉眼直接判定檢驗結果。此外，奈米金也因為擁有強的吸光係數即可改變的特殊吸收波長特性，故在光敏治療法中也佔有一席之地[158, 159]。

(二) 奈米碳管 (carbon nanotube, CNT): 於 1991 年由日本 NEC 公司研究員 Sumio Iijima 以弧狀放電法置備碳 60，並以穿透式電子顯微鏡觀察碳的團簇 (cluster) 時意外發現直徑約 1-30 奈米石墨平面捲曲而成之管狀材料，此即為多層奈米碳管 (multi-walled) 的發現[160, 161]。在生物醫學上，奈米碳管因為其生物毒性，導致應用的範圍較為侷限[162, 163]，不過仍有人成功將奈米碳管應用於細胞的微注射[164]。

(三) 微脂體 (liposome): 細胞膜 (cell membrane) 由脂質雙層膜 (lipid bilayer) 組成，成分主要為磷脂類 (phospho-lipid)，其中脂肪酸鏈為疏水端，磷酸端為親水性，脂肪酸鏈包埋於雙層膜之中，而磷酸端裸露於外層，造成整體親水性之構型。微脂體的構型與細胞膜相似，可均勻分布於水溶液中，並具有高度生物相容性即可分解性，故被應用於生物載體部分。水溶性物質與疏水性物質可被分別包埋於球心及脂雙層內，並藉由細胞膜的吸附 (absorption)、融合 (fusion) 與膜間轉換 (inter-membrane transfer) 等方式將所攜帶的藥物或物質帶入細胞[165-167]。

(四) 量子點 (quantum dot): 當量子點的三維皆被限制於 100 nm 以下時，其電子與電洞會被侷限於非常小的空間中，使其再結合的機率變大，導致發光效率相對增加。而量子點在激發光的能量超過其能隙 (band gap) 時，會吸收光子並導致電子由共價帶 (valence band) 躍升至導電帶 (conduction band)，當電子由導電帶回到共價帶時，會放出螢光。當塊材的大小變小時，因原子數減少，造成能階密度 (density of states) 降低，能階間隔變大，有效能帶增大，導致吸收與螢光光譜產生藍位移 (blue shift) 現象。換句話說，當粒子越小，相同材料所製成之量子點會有更短之螢光光譜。所以即便是單一光源，量子點可以因為大小不同而產生不同的螢光顏色，另外量子點相較於傳統螢光染劑，擁有更佳之亮度與穩定度。故量子點可用於長時間與即時的生物分子追蹤，對於診斷與醫療治療有相當大的應用空間[168-170]。

(五) 奈米鑽石 (nanodiamond): 奈米鑽石大約在 1980 年代被發展出來，主要的製造方法為使用黃色炸藥-三硝基甲苯 (trinitrotoluene, TNT) 在負氧的環境下爆炸產生，因為奈米鑽石於短時間 ( $<10^{-6}$  秒) 的高溫高壓下生成，故其顆粒大小大約只有 4~10 nm。由結晶學來看，因為奈米鑽石生成的時間短，溫度高 ( $10^3$  K)，加熱速度過快 ( $10^9$  K/s)，導致鑽石內的晶體生成時容易出現大量的晶格缺陷，稱為氮空位缺陷中心 (nitrogen-vacancy defect center, NV center)，有研究指出，奈米鑽石中的氮空位缺乏中心與螢光有關[171, 172]。一般而言，最外層與最內層電子軌域間之能量差即為能隙 (band gap)，而在奈米鑽石中，因所含有的原子數減少，各原子被周圍原子的影響也變少，產生量子侷限效應 (quantum confinement effect)，產生非連續性的離散電子能階，而能隙也會因奈米化而變寬，電子能階非連續化及能隙變寬現象，稱為量子尺寸效應 (quantum size effect)[173, 174]。

奈米鑽石已經被證明有高度生物相容性及低生物毒性，可當做輸送基因與藥物的載體 [175-177]，並且經由吸收雷射的能量後，會因熱聲子效應而使其轉換為石墨結構 ( $sp^3$  to  $sp^2$ )，造成體積膨脹[178]，可破壞特定目標，達到治療的目的。

### 壹-1-3 多光子效應 (multiphoton effect)

多光子激發 (multiphoton absorption) 為一非線性之光學效應，指的是於高強度之激發光激發下，一個分子同時吸收多個光子，由基態轉變為激發態之過程，其吸收能量等同於頻率為  $n$  個單光子所提供之能量，即能量為  $nv$ 。於單光子效應中，分子經由逐次吸收單個光子先躍遷至中間態，再藉由吸收單個光子而躍遷達到最終激發態，故在單光子吸收效應中，分子會停留在許多不同能階的階段性激發態；而雙光子激發則是受激發之分子同時吸收兩個光子而躍遷至激發態，其所受能量相當  $2v$  之單光子激發能量，但因需要兩個光子同時激發而躍遷至激發態，故躍遷機率 (transition rate) 正比於入射光強度的平方，且雙光子受吸收截面低之緣故使得其須極高之瞬間功率方可產生有效激發；而於多光子吸收過程中，分子會直接由基態躍升至最終激發態，不會有任何的階段性激發態存在，此為三者最大之差異[179, 180]。

一般來說，多光子效應所需吸收之光子密度非常高，一般於自然界中不易發生，本實驗室使用高密度脈衝雷射來做為實驗工具，而使用多光子效應激發時須考量生物分子與細胞所能承受之最大能量[181]，而對於奈米鑽石之多光子吸收效應，雖然其因此原理激發可造成結構上劇烈改變，但應用於生物體中則必須配合在生物分子或細胞所能承受之功率範圍，故須進一步探討此奈米分子於生物醫學之應用性。

## 壹、第二章 研究動機與策略

### 壹-2-1 研究動機

本研究結合了奈米科學及生物技術開發了一項新的癌症奈米標靶粒子 (nano targeting complex)，其利用奈米鑽石為基礎，接合上與癌細胞具有靶向性之生物分子來做為一治療工具。奈米鑽石本身內部為一穩定的  $sp^3$  結構並具有高度生物相容性，由本實驗室先前研究指出，經由高脈衝雷射之激發後奈米鑽石結構重新排列成  $sp^2$ ，以穿透式電子顯微鏡 (transmission electron microscopy, TEM) 影像觀察得知其體積膨脹十多倍之多 [178]，依此特性與概念設計出的奈米標靶粒子-羧酸化奈米鑽石與生長激素受體結合蛋白及綠螢光蛋白之複合物 (cNDGHRBP-GFP complex)，其接合了肺癌細胞表面大量表現之生長激素受體的專一性結合蛋白，也做為一競爭劑 (antagonist)，以及可用來標定癌細胞位置的綠螢光蛋白，加上高脈衝雷射誘導奈米鑽石爆炸，可進行破壞癌細胞組織之動作，此為類光敏治療的方法，可免除侵入性手術問題，並準確控制癌細胞死亡之程度與區域，避免大量細胞同時死亡所帶來的傷害。依照上述特性，可將多光子趨動標靶化奈米鑽石開發為新一代癌症治療平台。

依實驗策略，我們想知道細胞經處理 cNDGHRBP-GFP 並使用高能脈衝雷射激發 cNDGHRBP-GFP 後可以對癌細胞造成何種程度之影響，並且於學術上，我們研究當中誘導細胞死亡或損傷之分子機轉。爾後，加上癌症細胞特定表現或活化之標靶分子，期望能夠發展並建立出一套針對清除癌細胞之目的具有更專一、有效率的標靶治療之系統，並利用於生醫領域上。



## 壹-2-2 研究策略



## 壹、第三章 實驗策略原理

### 壹-3-1 蛋白質的表現與純化

為了獲得實驗中所需要之癌症標定蛋白質及觀察用標的物，我們使用本實驗既有之分生技術，表現與純化出實驗中所需要之生長激素蛋白質與綠螢光蛋白。將所需之基因片段與 pET28a 與 pET-30a 載體做接合，而後送入大腸桿菌 (*Escherichia coli*, *E. coli*) BL21(DE3) 中，待細菌生長至對數期 (log phase) 時加入 IPTG 誘導蛋白質大量表現，IPTG 為乳糖相似物，可誘導乳糖操作組後的 T7 聚合酶 (T7 polymerase) 大量表現，而被誘導表現的 T7 聚合酶會與載體 pET28a 及 pET-30a 上的噬菌體 T7 啟動子 (T7 promoter) 結合並誘導在 T7 序列後端所接合之欲表現的基因；且 pET-30a 上含有組氨酸 (histidine) 之序列，一串六個組氨酸所組成的組氨酸標籤 (Histidine tag, His. Tag) 具有金屬親和性，將含有組氨酸標誌之蛋白質通過含鎳離子 ( $\text{Ni}^{2+}$ ) 的親和性層析管柱，此時組氨酸會與鎳離子螯合而結合在管柱上，而菌液中其它不含組氨酸標誌的蛋白質會流出管柱中，達到純化的效果。

### 壹-3-2 EDC、sulfo-NHS 的蛋白質接合

為了將奈米鑽石與蛋白質接合，製造有標靶功能的奈米鑽石，我們使用化學交聯劑：二亞胺基碳與 N-羥基琥珀酰亞胺進行奈米鑽石、生長激素、綠螢光蛋白之接合。二亞胺基碳 (1-Ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimide hydrochloride, EDC) 常做為交聯劑 (crosslinker) 與 N-羥基琥珀酰亞胺 (N-Hydroxysulfosuccinimide sodium salt, sulfo-NHS) 應用於一些化學接合反應中，以形成胺反應 (amine-reaction) 或是化合物 (compound) 的接合。二亞胺基碳分子量 191.7，為一個零長度的交聯劑 (zero-length crosslinking agent)，利用脫水方式聯結羧酸基 (-COOH) 與胺基 (-NH<sub>2</sub>)；而分子量 217.13 之 N-羥基琥珀酰亞胺在聯結羧酸基與胺基的反應中，對反應物進行修飾，使其穩定而提高接合效率。任何化合物、生物分子或奈米粒子只要帶有羧酸基即可與二亞胺基碳以及 N-羥基琥珀酰亞胺進行活化使能夠反應，與帶有胺基者，例如蛋白質形成共價接合[182]。

為了使本實驗用的奈米鑽石利於與蛋白質接合，故事先會以化學修飾使奈米鑽石表面帶有羧酸基，此時，利用水溶性之二亞胺基碳以及 N-羥基琥珀酰亞胺的活化，羧酸基可以與蛋白質上的胺基形成醯胺鍵鍵結。N-羥基琥珀酰亞胺在此反應中用以修飾羧酸基使形成胺反應酯 (amine-reactive ester)，而二亞胺基碳會在羧酸基與 N-羥基琥珀酰亞胺的羥基 (hydroxyl group) 間造成脫水反應，生成 N-羥基琥珀酰亞胺-酯的活化分子 (sulfo-NHS-ester-activated molecule)，此中間物的穩定特性可以使反應更有效率。而透過此分子上帶有羧酸基，其又會自發性與帶有胺基的分子發生反應，合成實驗所需的 cND-rEaGH-GFP 複合物。

### 壹-3-3 原子力顯微鏡 (Atomic force microscopy, AFM)

原子力顯微鏡是於 1985 年由 Gerd Binnig 及 Heinrich Rohrer[183]所研發問世，其利用探針與樣品之間的原子間作用力(包含靜電排斥力 (electrostatic repulsion)、萬有引力 (universal gravitation)、凡得瓦爾力 (van der Waals forces) )來描繪出樣品表面形貌[184, 185]，幾乎可應用於所有樣品上。

AFM 系統可區分成三個部份，包含原子間作用力感測器：懸臂 (cantilever)、懸臂偏移量感測器及位移掃描系統。利用懸臂上探針針尖之原子感測樣品表面原子間之作用力，配合光學式雷射對焦於懸臂上並反射至位移敏感的感光二極體 (position sensitive photo-diode, PSPD) 定位，當原子間作用力變化造成懸臂產生彎曲偏移時，其雷射光反射點亦產生偏移，此時感光二極體即可依雷射光點之偏移量推算懸臂偏移量，再配合壓電晶體掃描器 (piezoelectric scanner) 進行三軸位移掃描，即可描繪出樣品表面之高低起伏之形貌[186]。

本實驗利用原子力顯微鏡作為觀察 cND-GHRBP-GFP 複合體之外型及均勻度分析。

### 壹-3-4 動態光散射儀 (Dynamic light scattering, DLS)

動態光散射儀又稱為光子關聯光譜法 (photon correlation spectroscopy, PCS)[187]。當雷射光射入含有懸浮粒子的溶液中，雷射光會因為撞擊粒子而產生散射光，此時散射的雷射光會隨時間而改變，再由其間散射光強度之變化來計算溶液中粒子之平均粒徑大小與分佈。而其原理係利用一般粒子懸浮於溶液中時會進行布朗運動 (Brownian motion)[188]，依粒子大小的不同，布朗運動的速度也有所不同，粒子愈小速度愈快，反之粒子較大則速度較慢。動態光散射儀利用雷射光打入溶液中，當雷射光打中懸浮粒子時會產生雷利散射 (Rayleigh scattering)，且粒子進行布朗運動中不斷移動，散射光強度隨時間改變造成不同之趨勢與幅度，此時，利用時序上的自相關函數求得其擴散係數 (diffusion coefficient)，再以 Stokes-Einstein equation 計算出粒子之水和半徑。此儀器量測範圍可從幾奈米至幾微米。

$$\text{Stokes-Einstein equation : } D = \frac{k_B T}{6\pi\eta r} \dots\dots\dots(\text{Eq. 1})$$

在 Stokes-Einstein equation 中， $D$  為擴散係數， $k_B$  為波茲曼常數 (Boltzman constant)， $T$  為絕對溫度 (absolute temperature)， $\eta$  為溶液之黏滯係數 (viscosity)， $r$  為球形粒子之水合半徑 (hydrophobic radius)。

利用動態光散射儀，可測定 cND-GHRBP-GFP 複合體之粒徑大小。

### 壹-3-5 螢光儀 (Fluorescence spectrometer)

當分子吸收可見光或紫外光時，位於基態 (ground state) 能階的電子會被激發至激發態 (excited state)，在激發態的電子隨即以不同的能量方式(光或熱)衰退回基態，此時若以放出光的形式衰退回基態，即產生所謂的螢光 (fluorescence)。



針對固定波長的螢光判讀，儀器只會固定在實驗所設定的波常範圍進行檢測，而對於全光譜之掃描，則儀器會針對每一組波長累積量測值。對於先前之文獻指出，奈米鑽石因晶格缺陷致使其本身在雷射激發下會產生螢光訊號[171, 172]。但有趣的是，本實驗所使用之奈米鑽石發現與過去研究不符合，無論以螢光顯微鏡之汞燈或共軛焦顯微鏡之雷射光源做激發皆不產生螢光訊號，故利用螢光儀對於奈米鑽石作全光譜分析。全光譜掃描一般來說可以幫助找出樣品的螢光波峰，對於本研究則做為判讀奈米鑽石是否具有螢光特性之研究工具。

#### 壹-3-6 奈秒脈衝雷射 (Nano-second pulse laser)

超快雷射一般依雷射光之脈衝寬度可區分為飛秒 (femtosecond, fs)、皮秒 (picosecond, ps) 及奈秒 (nanosecond, ns) 等級，本實驗所使用之雷射為以 Nd:YAG 作為激光介質之奈秒脈衝雷射。

Nd:YAG (neodymium-doped yttrium aluminium garnet;  $\text{Nd:Y}_3\text{Al}_5\text{O}_{12}$ ) 為一種晶體，現在常用作為固態雷射 (solid-state lasers) 的激發光源 (pumping source) 中的激光介質。其中，Nd 為化學鑰系元素汝，原子序為 60；YAG 為  $\text{Y}_3\text{Al}_5\text{O}_{12}$ ，是鈮鋁石榴石晶體。傳統的雷射光指的是必須以光學共振腔來收集所激發出的光以減低耗損；而在 Nd:YAG 雷射中，將 Nd 原子植入 YAG 晶體後，當 Nd 游離為  $\text{Nd}^{3+}$  並形成 Nd:YAG，其即為一個四能階之系統，同時具有激發率高且雷射光強之優點。並且於 1964 年，首次由 Geusic 等人進行由 Nd:YAG 所媒介之雷射操作[189]。

以 Nd:YAG 作為激光介質激發後，會產生 1064 nm 之紅外光雷射，而若經由倍頻器，則可達到 532 nm 之綠光雷射及 266 nm 之紫外光雷射光，並使用於本實驗中。另外，奈秒脈衝雷射因加工速率高，並具有低操作成本之優點，故現今已廣泛應用於工業加工上。

#### 壹-3-7 拉曼光譜 (Raman spectrum)

所謂之拉曼 (Raman) 光譜起因於光之散射 (scattering) 所造成，即入射光之電磁波電場向量與被激發之物質其本身所帶的電子交互作用下，導致入射光線散射。拉曼光譜中，利用聲子 (phonon，為晶格中的振動) 與光子 (photon) 之間的交互作用，量測並計算光子散射前後之能量差，由此可進一步得之光子的振動模式 (vibration mode) 為何，又可以說，拉曼光譜與分子之振動能 (vibration energy) 相關。

一般，當入射光與分子作用時，電子會由最低能階之基態 (groundstate) 躍遷至虛態 (virtual state)，此時分子不會吸收能量，而隨即以散射之方式將能量釋放出來。若此釋放出之能量恰相等於入射光子的能量，則此散射光稱做雷利散射 (Rayleigh scattering)；反之，若此釋放出之散射光能量不等於入射光子之能量，則此散射光稱為拉曼散射 (Raman scattering)。在拉曼光譜中為偵測散射光子與入射光子之頻率差， $\omega$ ，此即為拉曼位移 (Raman shift)，而這之中所對應之能量即代表分子之振動能量。

在光的散射現象中，入射光光子被分子散射之機率約為百萬分之一，其中大多數散射光都為雷利散射，而拉曼散射之強度則僅只有雷利散射強度之千分之一。對於拉曼散射強度較微弱之特性對於實際偵測上所造成的限制，於 1968 年美國科學家 Tobin 率先

利用雷射光作為激發光源來量測蛋白質樣品之拉曼光譜，此方式大大增強了拉曼散射之訊號[190]，而後，以雷射光作激發光源之拉曼光譜儀廣泛應用於化學、生化方面的研究。於此，本實驗係利用拉曼光譜作為觀察經由不同條件下之雷射激發後，奈米鑽石內部化學結構的改變。

### 壹-3-8 蛋白質定量法

#### 壹-3-8-1 Bradford dye-binding method

此蛋白質定量方法使用考馬司亮藍 G-250 (Coomassie Brilliant Blue G-250, CBG250) 染劑來做為呈色的物質。當 CBG250 與芳香族胺基酸或鹼性蛋白質結合後，其最大吸光波長 ( $\lambda$ ) 會由 465 nm 轉為 595 nm[191]，而 CBG250 會依不同 pH 環境下呈現不同顏色，於酸性環境時為茶色，在中性下為藍色，故蛋白質所提供相對中性之環境可使 CBG250 變成藍色。依此原理，藉由所生成的藍色產物與樣品混合液在 O.D.595 時測定之吸光值可進一步推算內含蛋白質的濃度，即其所呈現之藍色深淺與蛋白質含量成正比。

操作時，將標準蛋白-牛血漿白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 序列稀釋成不同濃度，加入 CBG250 反應後，以 ELISA reader 讀取波長 595 nm 之吸光值，依此吸光值做出一條標準曲線，將樣品所測得之吸光值對照標準曲線後，可得出待測蛋白質之濃度。

#### 壹-3-8-2 紫外光吸收法 (UV absorption)

由胺基酸所組成的蛋白質，其中的酪胺酸 (tyrosine)、色胺酸 (tryptophan) 及苯丙胺酸 (phenylalanine) 等屬於芳香族胺基酸，三者之側鏈帶有苯環 (aromatic ring)，因苯環具有穩定的共軛雙鍵，使之具有可吸收紫外光之特性。當中，酪胺酸與色胺酸在  $\lambda = 280$  nm 時有最大吸光值，而苯丙胺酸則在  $\lambda = 260$  nm 時有最大吸光值。因為色胺酸之吸光值大於酪胺酸，而此二者之吸光值又遠大於苯丙胺酸，故通常會將苯丙胺酸之吸光值忽略不計算入內[192]。

一般操作時，會將分光光度計在波長為 280 nm 下量測，所測得之待測樣品吸光值與標準蛋白質之標準曲線做比對，所得蛋白質樣品之吸光值會與溶液中的蛋白質含量成正比，因此當吸光值在線性範圍時(即 O.D.值小於 1)，皆可進一步推測蛋白質濃度。

### 壹-3-9 十二烷基硫酸鈉聚丙稀醯胺凝膠電泳 (SDS-PAGE)

十二烷基硫酸鈉聚丙稀醯胺凝膠電泳 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 為一種常用於分離蛋白質分離之技術。主要是經由十二烷基硫酸鈉 (sodium dodecyl sulfate, SDS) 將蛋白質進行變性處理，利用聚丙稀醯胺凝膠 (polyacrylamide gel) 之膠體內孔洞大小決定蛋白質於膠體中之泳動速率。一般來說，欲分離脂蛋白質分子量愈大，所受之阻力亦愈大，則移動之速率慢，移動距離短；反之，欲分離之蛋白質分子量愈小，其所受阻力也愈小，此時其泳動之速率相對快，移動之距離也遠。根據此原理，可依不同濃度之聚丙稀醯胺形成不同孔洞大小，進一步可分離不同分子量大小之蛋白質。

### 壹-3-10 西方墨點法 (Western blot)

西方墨點法一般是以十二烷基硫酸鈉聚丙烯醯胺凝膠電泳為基礎，以期來分離不同分子量之蛋白質樣品，並進一步轉漬到固相載體上(常用例如：NC membrane、PVDF membrane)，在固相載體中，蛋白質會以非共價鍵的形式吸附於其上，同時能夠維持十二烷基硫酸鈉聚丙烯醯胺凝膠電泳時分離之多肽的生化活性。本實驗室所使用之固相載體為聚二氟乙烯膜 (polyvinylidene difluoride membrane, PVDF membrane)，其為一種疏水性材質，蛋白質可藉由本身之疏水端接合於其上。

利用能夠與目標蛋白質互相辨識之特定一級抗體 (primary antibody) 作為一個探針 (probe)，藉由兩者的專一性結合並以帶有一些發光物質或酶之二級抗體 (second antibody) 來標記與作為後續顯色，而後利用加入此發光物質的基質 (substrate) 使具有目標蛋白之位置顯色，再利用曝光、壓片之技術以分析樣品中微量之目標蛋白表現量以及可約略估算其分子量。此研究皆使用接有辣根過氧化酶 (horseradish peroxidase, HRP) 之二級抗體，並使用之基質係為化學發光法之 ECL 試劑盒，辣根過氧化酶能夠有效的催化氨基苯二酰一胍 (luminol) 與過氧化氫 (hydrogen peroxide,  $H_2O_2$ ) 反應，即可產生化學冷光放光。最後藉由曝光後壓片，以顯影劑顯影、定影劑定影即可進行數據分析。

### 壹-3-11 錐蟲藍排除法 (Trypan blue exclusion)

錐蟲藍 (trypan blue) 係於 1904 年由德國科學家 Paul Ehrlich 首先合成，常用於細胞染劑，常應用於觀察與分析細胞之存活。一般，活細胞之細胞膜為完整的，對物質進出具有選擇性的通透性，此時，染料無法滲透入細胞中，則細胞不會有顏色，且於顯微鏡下多為圓形且光亮；而不健康或死亡之細胞，因細胞膜通透性改變亦或是細胞膜破裂，使得染劑得以進入細胞中，故細胞會呈現藍色。此時，藉由顯微鏡下細胞顏色之區隔，可便於實驗分析細胞存活狀況。

### 壹-3-12 MTT

3-(4,5-二甲基噻唑-2-烲基)-2,5-二苯基四氮唑溴鹽 (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT) 由 Mosmann 於 1983 年所提出，因活細胞粒線體當中的琥珀酸去氫酶 (succinate dehydrogenase) 可以將 MTT 的四唑紫 (tetrazolium) 還原成紫色且不溶於水的甲臍 (formazan)，formazan 會堆積於活細胞中，利用二甲基亞砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO) 溶解之，再以 565 nm 的光作激發，而後讀取 O.D. 值進行數據分析。又 formazan 與活細胞數目成正比，即其代表活細胞中粒線體之活性，故可依此方法推算活細胞之比例。

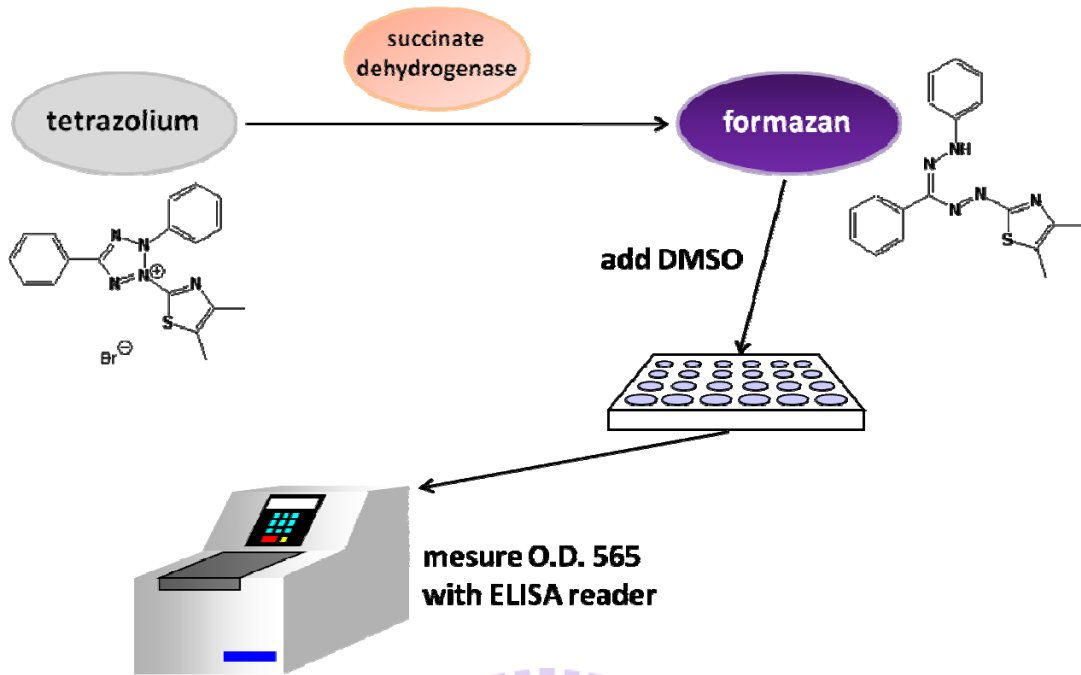


圖 2、MTT 於細胞內之作用機制

### 壹-3-13 螢光顯微鏡 (Fluorescence microscopy)

螢光之工作原理係由螢光物質化合物吸收一定特定波長的激發光(excitation light)的能量，會放出另一波長的發散光(emission light)，通常 emission light 的波長較 excitation light 長，以下列能階圖解釋：

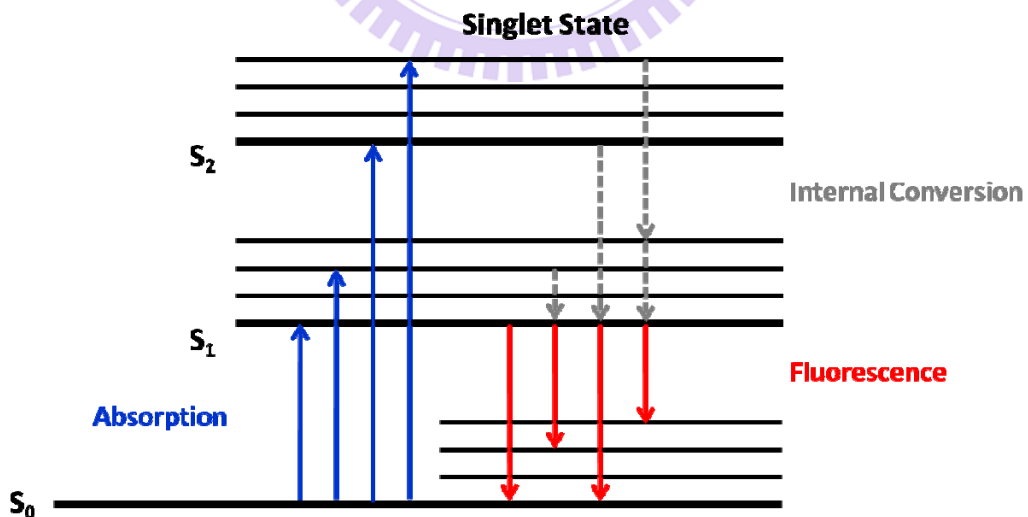


圖 3、螢光能階圖

圖中， $S_0$  為基態， $S_1$  為第一電子激發態， $S_2$  為第二電子激發態。



大多數分子在室溫時均處於電子最低能階，稱為基態 ( $S_0$ )。當物質吸收與其本身頻率一致的光子，其電子會由原來的能階躍遷至第一電子激發態 ( $S_1$ )或第二電子激發態 ( $S_2$ )。分子在第一電子激發態的最低能階停留約  $10^{-9}$  秒之後，直接下降至電子基態的各個不同震動能階，此時會以光的形式釋放出多餘的能量，即為螢光。

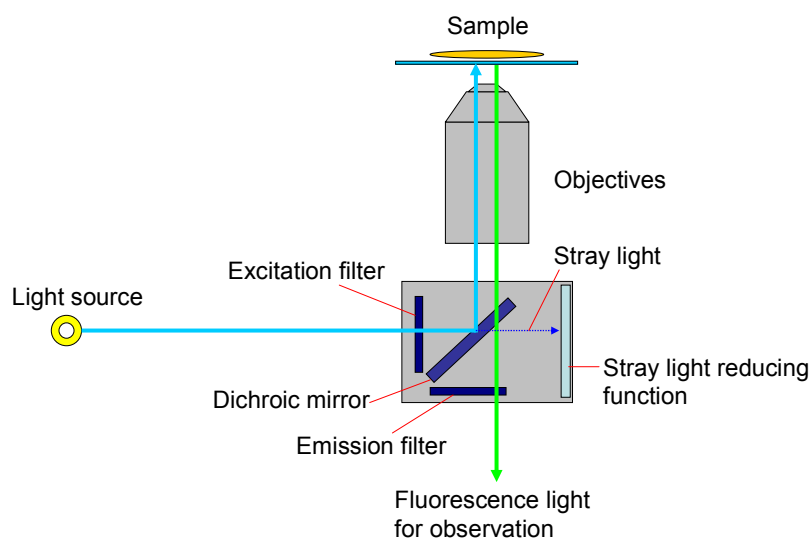


圖 4、倒立螢光顯微鏡光路圖

在螢光顯微鏡中，各個 filter 的作用分別如下：1. Exciter 為過濾激發光源，只讓特定波段的光源穿透，並避免雜訊干擾；2. Emitter 設置於 detector 之前，用以過濾樣品受激發後產生之發射光源，只讓特定波段的光源通過，並避免雜訊干擾；3. 分光鏡 (dichroic mirror) 功能是将光線依不同波長而分開，例如標示 "450 nm long pass" 的 dichroic mirror，表示可使大於 450 nm 的光線通過，小於 450 nm 的光線則無法通過。若是 450 nm short pass 則是允許短於 450 nm 波長之光線通過，而長於 450 nm 的光線則被折射。bandpass 用於反射激發光源，使其光源經由物鏡到達樣品，樣品受激發後產生之發射光源會穿透分光鏡而呈像。

螢光顯微鏡係以全光汞燈光源(含紫外線光源)做為激發光源，並以特定波長之濾片來觀察螢光物質。操作時，必須配合樣品中所含的螢光物質之特定激發波長來選擇螢光濾片，在較高能量的波長激發下產生較低能量波長的螢光後，混合有激發光與螢光的光線中，分離出單純螢光來做為觀察。

螢光物質或螢光染劑會以較短波長的光加上足夠能量所激發，當其回到穩定能階會釋放出較長波長的螢光。若非螢光物質或無螢光物質，則背景為全黑色的訊號。

#### 壹-3-14 共軛焦顯微鏡 (Confocal microscopy)

傳統顯微鏡的聚焦面較廣，景深也較深，此些特點將造成觀察上相對模糊的現象。為解決此問題，即於顯微鏡擷取影像設備前裝置了一個微小針孔 (pinhole) 以過濾掉非聚焦面之影像，提升影像之解析度；而當 pinhole 之孔洞越小，則過濾掉之影像越多，

解析度相對較高，但此時掃描速度也相對愈慢。在共軛焦顯微鏡中，利用對顯微鏡 Z 軸不同平面的控制取得一組解析度高的光學切片訊號，可針對樣品厚度或掃描性質針對 Z 軸設定不同掃描厚度，依照設定值做斷層掃描的取樣，而後可以將由上至下或由下至上的掃描切片重組成 3D 影像，亦可以說共軛焦顯微鏡提供了縱軸的高解析度，並且同時具有高對比性質以及螢光亮度的平衡較佳等等優點。

#### 壹-3-15 免疫細胞染色 (Immunocytochemistry)

免疫細胞化學染色係將抗體結合上螢光物質或是可呈色之化學物質，利用抗體具有與其專一性抗原互相辨識並結合之免疫特性，可標記組織或細胞中存在的特定蛋白質。而標記上之螢光物質再依其特定激發波長之光源做激發，會發出另一特定波長的光，呈現出螢光訊號。此法常用於醫學與生物領域，可靈敏的檢出抗原表現位置與表現量。本實驗中用以觀察各目標蛋白於細胞中之表現與位置。

#### 壹-3-16 酵素連結免疫吸附法 (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)

酵素連結免疫吸附法於 1971 年首次由 Engvall 以及 Perlman 所提出，為一種偵測與定量特定蛋白質的代表性技術，並已普及應用於學術研究或臨床分析。此法利用抗體與抗原之間的專一性結合特性，將酵素以化學鍵結連接至抗原或抗體後，再以此來測定免疫複合物。實驗操作中，會將反應後過多而未被接合至免疫複合物上的酵素連結物質洗除，而後加入酵素之受質與其反應，最終再利用光學密度 (optical density) 來測量呈色後有色產物的量，即為用已知量的抗原測定未知抗體的量。此研究所製造之生長激素抗體即是利用酵素連結免疫吸附法來分析其效價。

## 壹、第四章 實驗材料與方法

### 壹-4-1 實驗材料

#### 壹-4-1-1 細胞株來源

本實驗所使用之細胞株為人類非小細胞肺腺癌細胞株 (human non-small cell lung cancer cell line) A549、人胎肺成纖維細胞 (human fetal lung fibroblast-1, HFL-1)，此二細胞株皆購自生物資源保存及研究中心 (Bioresource Collection and Research Center, BCRC)。

### 壹-4-2 實驗方法與步驟

#### 壹-4-2-1 蛋白質之表現與純化

(一) pET30a-rEaGH：取出冷凍於 $-80^{\circ}\text{C}$ 中 pET30a-rEaGH 之菌株凍管，待菌液回溶後取 30  $\mu\text{l}$  混合於 3 ml LB 培養基(含有 20  $\mu\text{l}/\text{ml}$  之抗生素 ampicillin)，置於  $37^{\circ}\text{C}$  恆溫培養箱中以中轉速搖晃菌液使其活化，待 4~6 小時細菌生長至對數期 (log phase)，將菌液以 1:1000 稀釋於 250 ml LB 培養液(含 1:1,000 稀釋之 ampicillin 抗生素)中，置於  $37^{\circ}\text{C}$  恆溫培養箱中以中高轉速搖晃菌液 12~16 小時，而後離心 12,000 g 收取細菌之沉澱。

加入 1:1,000 稀釋之胰蛋白酶抑制劑 pefabloc® SC (Merck KGaA., Darmstadt, Germany) 於蛋白質中，震盪均勻置於冰上，以物理破菌法破菌後，12,000 g 離心收取沉澱即為 rEaGH 蛋白質。加入適量蛋白質變性溶液 (protein denature buffer，見表二) 與 NaOH，震盪均勻使蛋白質變性並打開其中之雙硫鍵，以 1,0000 轉於  $4^{\circ}\text{C}$  離心 10 分鐘，取上清液以 0.22  $\mu\text{m}$  過濾膜過濾。準備適當長度透析膜先以 0.5 M 乙二胺四乙酸 (ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA) 螯合鈣離子與鎂離子後，使用二次水潤洗完，置入過濾完成之變性蛋白質，並以五個步驟(表三)將蛋白質摺疊回原有構型。

表二、蛋白質變性之緩衝溶液內含成分

蛋白質變性緩衝溶液成分 (pH=11)	
Urea	4.5 M
Tris-base	10 mM
DTT	0.1 M
Mannitol	0.1 %
Pefabloc	0.1 mM



表三、蛋白質摺疊過程各步驟之摺疊緩衝溶液內含成分

蛋白質摺疊緩衝溶液成分						
	Tris-base (mM)	pH	Urea (M)	DTT (mM)	Mannitol (%)	Pefabloc ( $\mu$ M)
<b>Folding buffer 1 (R1)</b>	10	11	2	0.1	0.1	0.5
<b>Folding buffer 2 (R2)</b>	10	11	1	0.1	0.1	0.5
<b>Folding buffer 3 (R3)</b>	10	11	-	0.1	0.1	0.5
<b>Folding buffer 4 (R4)</b>	10	8.8	-	0.1	0.1	0.5
<b>Folding buffer 5 (R5)</b>	10	8.8	-	0.1	-	0.5

(二) pET30a-Eam-GFP：取出冷凍於 $-80^{\circ}\text{C}$  中的 pET30a-Eam-GFP 菌株，室溫回溶菌液後，吸取 30  $\mu\text{l}$  混合於 3 ml LB 培養基(含有 20  $\mu\text{l}/\text{ml}$  之抗生素 kanamycin)，置於  $37^{\circ}\text{C}$  恆溫培養箱中先小量培養，待 4~6 小時細菌生長至對數期 (log phase)，將菌液以 1:1,000 稀釋於 250 ml LB 培養液(含有 20  $\mu\text{l}/\text{ml}$  稀釋之 kanamycin 抗生素)當中，置於  $37^{\circ}\text{C}$  恆溫培養箱中以中高轉速搖晃菌液 3~4 小時，而後離心 12,000 g 收取細菌之上清液即為含有 GFP 之蛋白質。而後，再以 His-tag column 純化出 GFP 蛋白質。

#### 壹-4-2-2 5 nm 羧酸化奈米鑽石之螢光 3D 全光譜分析

將 5 nm 羧酸化奈米鑽石以二次水稀釋成終濃度 0.1 mg/ml，取 1 ml 置入螢光石英比色管中，設定掃描時激發光波長範圍由 300 nm 至 800 nm，發射波波長接收範圍同樣由 300 nm 至 800 nm，光電倍增管通電電壓為 400 V，並以 30000 nm/min 之速度做掃描。

#### 壹-4-2-3 羧酸化奈米鑽石表面接合生物分子

以最終濃度 0.05 M MES、0.5 M NaCl 反應溶液 (reaction buffer, pH6.0)與 2 mg/ml cND 均勻混合，並加入最終濃度 2 mM EDC 及 5 mM Sulfo-NHS 均勻混合後，於室溫下避光並高速震盪 15 分鐘，而後加入終濃度 20 mM 之  $\beta$ -ME 混合均勻，並反應 10 分鐘。將欲接上 cND 之 rEaGH 與 GFP 蛋白質與上述溶液互相溶解均勻，控制蛋白質終濃度為 1 mg/ml (pH7.0)，於室溫下避光並高速震盪 2 小時。收及樣品並透析至二次水中，每 8、12、24、24 小時更換透析液，而後避光保存。

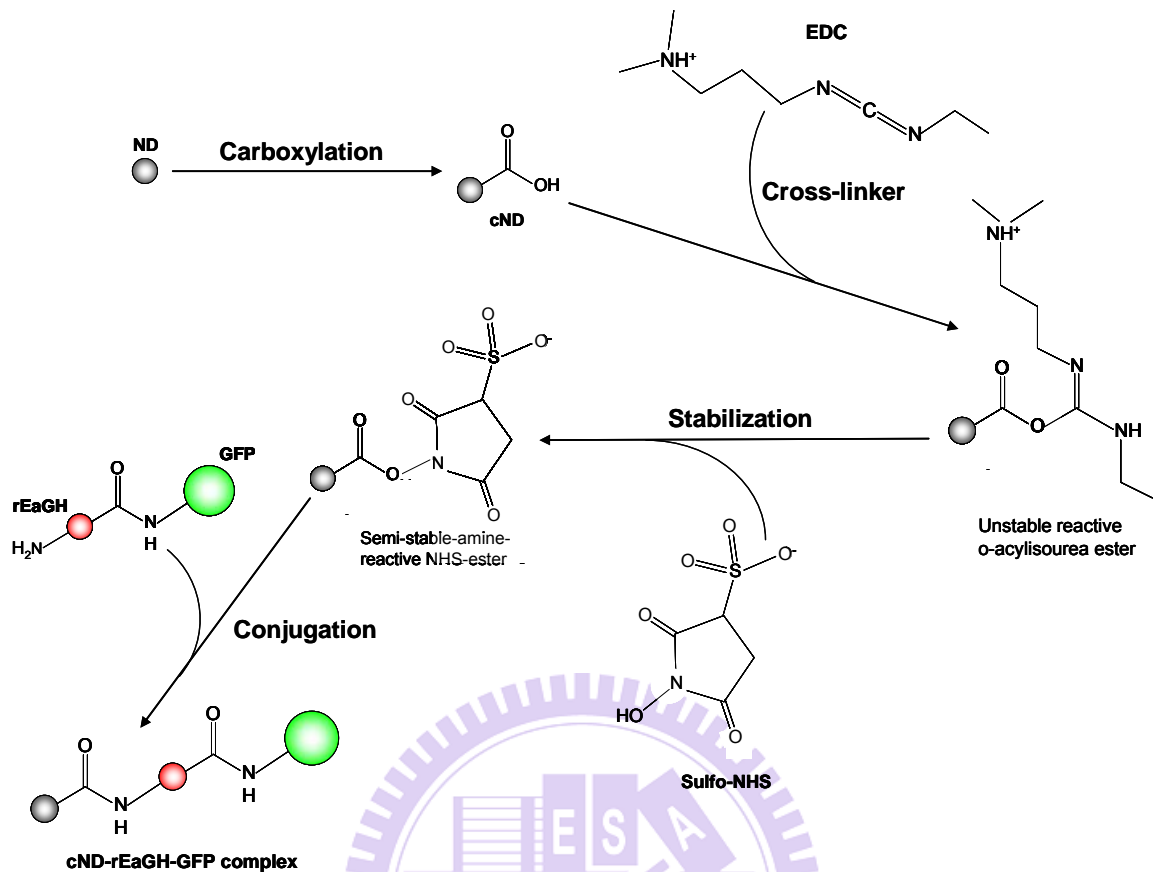


圖 5、利用 EDC 與 sulfo-NHS 接合 cND、rEaGH 及 GFP

#### 壹-4-2-4 以動態光散射儀分析 cND-GHRBP-GFP 複合體之平均粒徑大小

配置濃度 10  $\mu\text{g/ml}$  之樣品，並以 0.22  $\mu\text{m}$  濾膜過濾三次。動態光散射儀為 Brookhaven Inc., Holtsville, NY, USA，其型號為 BI-200SM Goniometer DLS。使用之雷射光波長為 532 nm，並接收 90° 散射光。

#### 壹-4-2-5 以原子力顯微鏡分析 cND-GHRBP-GFP 複合體之外型與均勻程度

使用之原子力顯微鏡為 Veeco di-Innova SPM，探針為 Nanosensors PPP-NCSTR，彈力係數 (force constant) 為 7.4 N/m，共振頻率 (resonance frequency) 160 kHz。樣品製備方法係先將樣品以超音波震盪器震 30 分鐘，再滴於雲母片 (mica) 上，靜置 20 分鐘後以去離子水 (di-water) 沖洗，並用氮氣吹乾，即可進行掃描。

#### 壹-4-2-6 GHRBP 之抗體製備

免疫小鼠：將 100  $\mu\text{l}$  之 1 mg/ml rEaGH 蛋白質混合佐劑後，以腹腔注射入 BALB/c 小鼠體內，每 7 天打一劑，共打三劑。將小鼠放血取血液並加入少量 EDTA，於 4°C 中以 12,000 g 離心 30 分鐘，離心完收取上清液(血漿)。

以 ELISA 分析抗體效價：以 1X PBS 稀釋 BSA-lysozyme 與 rEaGH 於終濃度 5 ng/ $\mu\text{l}$ ，加入 100  $\mu\text{l}$ /well coating 於 96 孔盤中，輕輕將氣泡拍除並於室溫下靜置反應 1.5 小時，

反應後以 200  $\mu$ l 之 1X PBS 潤洗一次，倒扣 96 孔盤並輕拍將 1X PBS 移除。以 1X PBS 配置含有 5% 脫脂牛奶之 blocking buffer，加入 100  $\mu$ l/well blocking buffer 靜置於室溫下反應 1 小時，反應後以 200  $\mu$ l 之 1X PBS 潤洗一次，倒扣 96 孔盤並輕拍將 1X PBS 移除。以 1X PBS 稀釋 mouse anti-rEaGH 抗體至 1/200、1/400、1/800……1/125,600，並分別加入 100  $\mu$ l/well 於 96 孔盤中室溫靜置 30 分鐘，而後以 wash buffer(以 1X PBS 配置含有 0.5 % 脫脂牛奶以及 0.05 % Tween-20)清洗三次。用 wash buffer 以 1:3000 倍稀釋二級抗體 (goat anti-mouse IgG conjugate HRP)，吸取 100  $\mu$ l/well 二級抗體加入 96 孔盤，靜置反應 30 分鐘後，以 wash buffer 清洗三次，再以 1X PBS 潤洗兩次。最後，於 ABTS 中均勻混合入 1:10,000 之 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>，加入 100  $\mu$ l/well 後避光反應 30 分鐘，使用 ELISA reader 測量 O.D. 405 之讀值。

以西方墨點法分析抗體之專一性：事先製備兩片含有 15 % acrylamide 之 SDS-PAGE，將 SVEC4-10、MCF-7、RKO、BFTC、A375、A549 等六個不同癌症細胞株內蛋白質樣品，以及 BSA 與 rEaGH 純蛋白質適量的與含有  $\beta$ -ME 之蛋白質樣品液 (sample buffer) 混合均勻，於 100 °C 破壞蛋白質結構 5~10 分鐘，取出樣品於 4 °C 冰上放置 5~10 分鐘後按照順序注入蛋白質膠中，以 80 V 跑上膠 30 分鐘，140 V 跑下膠至藍色染劑距離膠底 0.1 公分。收取跑完電泳之蛋白質膠片，其中一片以考馬氏亮藍染色，另一片將蛋白質轉漬於 PVDF membrane 上(固定電流 50 mA，參考電流 2.5 mA/cm<sup>2</sup>)，轉漬完成之 PVDF membrane 浸泡於 5 % 脫脂牛奶於室溫下緩慢搖晃 1 小時，競爭非抗體、抗原專一性結合之位置。將轉漬膜加入以 5 % 脫脂牛奶稀釋 1:10,000 倍之 anti-mouse GHRBP 一級抗體，於室溫下緩慢搖晃 2 小時，而後於室溫下以 1X TBST 清洗轉漬膜，每次 10 分鐘，共重複洗 3 次。加入以 5 % 脫脂牛奶稀釋之 goat anti-mouse conjugate HRP 二級抗體，於室溫下緩慢並均勻的搖晃 50 分鐘，而後於室溫下以 1X TBST 清洗轉漬膜，每次 10 分鐘，共重複洗 3 次。將轉漬膜以 HRP 之反應基質 ECL 反應 30 秒後，於暗房中依順序以藍底片曝光數秒至數分鐘，而後以顯影劑顯影、過清水潤洗掉顯影劑、以定影劑定影，風乾底片後以掃描機 (V750, EPSON, Osaka, Japan)掃描結果。

#### 壹-4-2-7 細胞培養

A549 細胞株以含有 10 % 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS;)、100 unit/ml 盤尼西林 (penicillin) 以及 100 mg/ml 鏈黴素 (streptomycin) 之 RPMI-1640 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 培養液做培養，並於 5 % 二氧化碳、95 % 濕度以及 37 °C 恆溫環境之培養箱中生長；而 HFL-1 則以含有 10 % 胎牛血清、100 unit/ml 盤尼西林以及 100 mg/ml 鏈黴素之 DMEM (Dulbecco's modified eagle medium; Invitrogen, Carsbad, CA, USA) 培養液做培養，並於 5 % 二氧化碳、95 % 濕度以及 37 °C 恆溫環境之培養箱中生長。平均每 2~3 天更換一次培養液，並於細胞生長至約 80~90 % 滿時進行繼代培養與分盤。

細胞繼代培養與分盤：黏附型細胞 (adherent cell) A549 以及 HFL-1 係以吸排器移除舊的細胞培養液，加入適量 1X PBS 潤洗細胞一至二次後移除 1X PBS，取適量胰蛋白酶-乙二胺四乙酸 (trypsin-EDTA; Biological Industries Ltd., Kibbutz Beit Haemek, Israel) 均勻加入盤中，置入 37 °C 恆溫培養箱中反應，使細胞脫離盤底成亮圓單顆粒狀後，加入

與胰蛋白酶-乙二胺四乙酸等量之細胞培養液，使其終止胰蛋白酶之作用(因血清內含有胰蛋白酶的抑制劑，能夠終止胰蛋白酶的反應)，將盤中細胞沖吸始均勻分離成單顆，收集至離心管中以 1,500 g 離心 5 分鐘。移除上清液，添加適量培養液重新使細胞均勻懸浮，而後進行細胞計數或直接吸取適量細胞液至培養盤中，放置於 37°C 恆溫培養箱中繼續培養。

細胞計數：吸取離心後重新以新鮮的細胞培養液懸浮之細胞液與相等體積之錐蟲藍 1:1 混合均勻，取少許混合液(約 20  $\mu$ l)自蓋有蓋波片之血球計數器 (hemocytometer) 凹槽注入細胞混合液，於倒立顯微鏡下觀察。計數九大方格中之五格大方格之細胞數後，將加總數目除以五後回乘稀釋倍數 2 倍，再乘以  $10^4$  (為血球計數器中容納細胞混合液之體積) 即為每 ml 中細胞懸浮液之細胞數目。

$$\text{每毫升細胞總數} = \frac{\text{計數細胞數目}}{5} \times 2 \times 10^4$$

細胞解凍活化：掌握解凍細胞須迅速回溫之原則，避免或降低冰晶對細胞之傷害。準備好已回溫至 37°C 之新鮮細胞培養液，自液態氮桶中取出凍管，馬上放入 37°C 水浴槽中回溫，快速解凍細胞。依凍管內細胞數目取適量新鮮細胞培養液以 10 倍稀釋凍管中的細胞液，兩者混合均勻後放置於 37°C 恆溫培養箱中培養，待隔日更換新鮮細胞培養液。視情況或細胞種類，若須於解凍後馬上移除冷凍細胞液中的二甲基亞砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO)，則將回溫解凍後之細胞液馬上加入含有 10 ml 新鮮細胞培養液支離心管中，以 1,200 g 離心 5 分鐘後移除上清液，加入適量新鮮培養液重新懸浮細胞，使細胞均勻分散於培養液當中後，置於 37°C 恆溫培養箱中培養。

細胞冷凍保存：當細胞生長到達對數期 (log phase) 即細胞生長密度大約至 80%~90%，並且細胞健康、存活率高時，可將細胞做冷凍保存，以利後續實驗之使用。冷凍細胞前先預配置冷凍保存溶液，將二甲基亞砜均勻混合於新鮮的細胞培養液中，使二甲基亞砜之中濃度為 7%；同時將冷凍管標示細胞名稱、來源、代數、細胞數目、操作者姓名以及冷凍日期，放置備用。依細胞繼代培養之操作，收取細胞懸浮液後計數存活之細胞數目，取細胞濃度為每毫升有  $1\sim 5 \times 10^6$  顆細胞並配合冷凍數量，以 1,200 g 離心 5 分鐘後移除上清液，輕拍打離心管中細胞使其分散成單顆細胞，而後加入體積為每一凍管 1 毫升的適當量細胞冷凍保存液與細胞液混合均勻，分裝每管 1 毫升之細胞冷凍液至冷凍管中。為防過程中因降溫太快速造成細胞內形成冰晶而導致細胞死亡，故最後依下列順序慢慢降溫(約每 1 分鐘下降 1°C) 進行冷凍保存：將凍管於 4°C 放置 30 分鐘→移至 -20°C 放置 30 分鐘→移至 -80°C 放置 16~18 小時 (或隔夜)→最後移入液態氮桶中保存。

#### 壹-4-2-8 利用倒立式螢光顯微鏡觀察 cND-GHRBP-GFP 複合體表現之螢光與奈米鑽石之位置

實驗前，樣品以超音波震盪器震盪 10 分鐘左右，而後將適量 cND-GHRBP-GFP 複合體均勻滴於薄載玻片上，於上方蓋上蓋玻片，以顯微鏡明視野觀察奈米鑽石(灰色顆



粒)之位置，以及以 488 nm 激發波長作激發以觀察 GFP 之位置。分別以 CCD 拍照後對照兩者之相對位置。

#### 壹-4-2-9 觀察 cND-GHRBP-GFP 複合體於細胞內之位置

細胞培養與處理：在 6 孔細胞培養盤中種入  $2 \times 10^5$  cells/well A549 細胞，放置於 37°C 恆溫培養箱中培養 18 小時。待 18 小時後，移除舊有細胞培養液，而後將細胞處理 1  $\mu$ g/ml cND-GHRBP-GFP 複合體，於 37°C 恆溫培養箱中作用 0.5 小時。

細胞染色：取出細胞樣品，以冰的 1ml 之 1XPBS 潤洗細胞後移除細胞廢液，重複此步驟兩次。加入 1 ml 4% paraformaldehyde，置於 37°C 恆溫培養箱中 1 小時以固定細胞，之後移除 paraformaldehyde 並以 1ml 之 1XPBS 潤洗後吸除，重複此步驟兩次。取 1 ml 之 blocking buffer (1X PBS 內含 10% FBS 以及 0.25% Triton X-100)加入樣品，於 37°C 下作用 1 小時，以去除非特异性結合位置，並增加細胞膜之通透性以利於最後步驟之細胞核染色。加入 1 ml 之 wash buffer (1X PBS 內含 0.25% Tween-20)，放置於室溫下中速搖晃清洗 10 分鐘，移除廢液後重複此步驟 3 次。加入以 wash buffer 稀釋 100 倍之  $\beta$ -tubulin conjugate Cy3 螢光二級抗體，放置於 37°C 恆溫培養箱中作用 0.5 小時。加入 1 ml 之 wash buffer，放置於室溫下中速搖晃清洗 10 分鐘，移除廢液後重複此步驟 3 次。以 wash buffer 稀釋 Hoechst 33342 核染劑 200 倍，加入樣品中並放置於 37°C 恆溫培養箱中作用 0.5 小時。加入 1 ml 之 wash buffer，放置於室溫下中速搖晃清洗 10 分鐘，移除廢液後重複此步驟 3 次。於載玻片表面滴上 15-20  $\mu$ l 之 80% 甘油，並將含有細胞樣品之載玻片以 45° 蓋下(細胞面朝上)，而後以透明指甲油封住蓋玻片周圍，置於室溫下避光待乾，並保存樣品於 4°C 冰箱中。

以共軛焦顯微鏡 (FV300, Olympus, Tokyo, Japan)觀察：以 100 倍油鏡拍攝。

#### 壹-4-2-10 以錐蟲藍細胞染色觀察細胞死亡情形

細胞培養與處理：在 6 孔細胞培養盤中種入  $5 \times 10^5$  cells/well A549 細胞，放置於 37°C 恆溫培養箱中培養 24 小時。待 24 小時後，移除舊有細胞培養液，以 500  $\mu$ l/well 之 1X PBS 潤洗細胞後，加入 800  $\mu$ l/well 不含有血清之 RPMI-1640 細胞培養液，分別以 0.1 s/step 之 266 nm 雷射與 10 s/step 之 532 nm 激發。以 500  $\mu$ l/well 之 1X PBS 潤洗細胞，並置於 37°C 恆溫培養箱中培養 24 小時。

細胞染色：將細胞培養盤中之細胞培養液抽乾，並加入適量之錐蟲藍於生長於蓋玻片上之細胞，待 1 分鐘後移除錐蟲藍，並於螢光顯微鏡之明視野下以 10 倍觀察細胞死亡情形與型態，並拍照。

#### 壹-4-2-11 利用細胞化學免液染色觀察細胞凋亡與細胞壞死相關蛋白

細胞培養與處理：在 6 孔細胞培養盤中種入  $5 \times 10^5$  cells/well A549 細胞，放置於 37°C 恆溫培養箱中培養 24 小時。待 24 小時後，移除舊有細胞培養液，而後將細胞處理 1  $\mu$ g/ml cND-GHRBP-GFP 複合體，於 37°C 恆溫培養箱中作用 0.5 小時，而不處理組作為對照。將細胞培養液抽乾，並加入 800  $\mu$ l/well 之無血清 RPMI-1640 細胞培養液，分別

以 0.1 s/step 之 266 nm 雷射與 10 s/step 之 532 nm 激發。而後以 500  $\mu$ l/well 之 1X PBS 潤洗細胞，並置於 37°C 恆溫培養箱中培養 24 小時。

細胞染色：取出細胞樣品，以冰的 1ml 之 1XPBS 潤洗細胞後移除細胞廢液，重複此步驟兩次。加入 1 ml 4% paraformaldehyde，置於 37°C 恆溫培養箱中 1 小時固定細胞，之後移除 paraformaldehyde 並以 1ml 之 1XPBS 潤洗後吸除，重複此步驟兩次。取 1 ml 之 blocking buffer 加入樣品，於 37°C 下作用 1 小時，去除非特異性結合位置，並增加細胞膜之通透性。加入 1 ml 之 wash buffer，放置於室溫下中速搖晃清洗 10 分鐘，移除廢液後重複此步驟 3 次。分別以 1X PBS 稀釋 rabbit anti-caspase-3、mouse anti-AIF、mouse anti-COX-2 之一級抗體，並加入細胞樣品中，於 37°C 恆溫培養箱中靜置作用 1 小時，以 1 ml 之 wash buffer 加入其中，放置於室溫下中速搖晃清洗 10 分鐘，移除廢液後重複此步驟 3 次。再以 1X PBS 稀釋 goat anti-rabbit conjugate Cy3 之螢光二級抗體，加入細胞樣品後置於 37°C 恆溫培養箱中靜置作用 0.5 小時。加入 1 ml/well 之 wash buffer，於室溫下中速搖晃清洗 10 分鐘，移除廢液後重複此步驟 3 次。加入以 wash buffer 稀釋 100 倍之 F-Actin conjugate Phalloidin 螢光二級抗體，放置於 37°C 恆溫培養箱中作用 0.5 小時。加入 1 ml 之 wash buffer，放置於室溫下中速搖晃清洗 10 分鐘，移除廢液後重複此步驟 3 次。以 wash buffer 稀釋 Hoechst 33342 核染劑 200 倍，加入樣品中並放置於 37°C 恆溫培養箱中作用 0.5 小時。加入 1 ml 之 wash buffer，放置於室溫下中速搖晃清洗 10 分鐘，移除廢液後重複此步驟 3 次。於載玻片表面滴上 15-20  $\mu$ l 之 80% 甘油，並將含有細胞樣品之載玻片以 45° 蓋下(細胞面朝上)，而後以透明指甲油封住蓋玻片周圍，置於室溫下避光待乾，並保存樣品於 4°C 冰箱中。

以共軛焦顯微鏡 (FV1000, Olympus, Tokyo, Japan) 觀察：以 60 倍油鏡拍攝。



## 壹、第五章 實驗結果

### 壹-5-1 重組生長激素受體結合蛋白質表現與純化

本實驗室事先轉殖重組生長激素受體結合蛋白以及綠螢光蛋白，於大腸桿菌 BL21 DE3 中生長複製，配合 IPTG 誘導約 14~16 小時，可獲得所需表現蛋白質。

在生長激素部分，其分子量大約為 22 kDa，且平均每一公升的菌液可生產約 0.7~0.8 克內涵體蛋白質，且純度高達 95%以上(圖 6)。綠螢光蛋白則以自然態存在於上清液中及聚集於內涵體中(圖 7)，取其上清液並經由 His-tag 管柱純化後，純度也可高達 95%以上，每公升的菌液約可產生 0.3g 的自然態綠螢光蛋白，分子量約為 32 kDa(圖 8)。

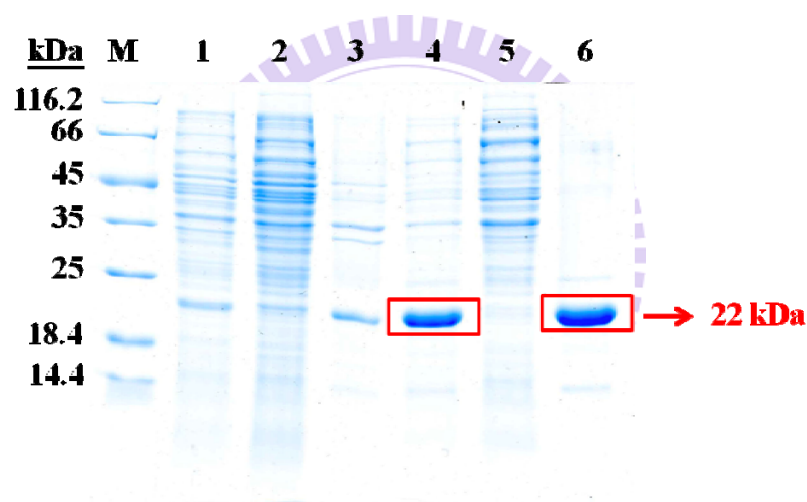


圖 6、pET28a-GH 以 IPTG 誘導大量表現後之 SDS-PAGE

M 為蛋白質分子量標準溶液；1 為未以 IPTG 誘導下，BL21 pET28a-GH 菌液破菌完成後細胞內總蛋白質；2 為未以 IPTG 誘導之 BL21 pET28a-GH 菌液，經由破菌、離心後的蛋白質上清液 (supernatant)；3 為未以 IPTG 誘導之 BL21 pET28a-GH 菌液，經由破菌、離心後的蛋白質沉澱 (pellet)；4 為以 IPTG 誘導 18 小時後，BL21 pET28a-GH 菌液破菌完成後細胞內總蛋白質；5 為以 IPTG 誘導 18 小時後之 BL21 pET28a-GH 菌液，經由破菌、離心後的蛋白質上清液；6 以 IPTG 誘導 18 小時後之 BL21 pET28a-GH 菌液，經由破菌、離心後的蛋白質沉澱。

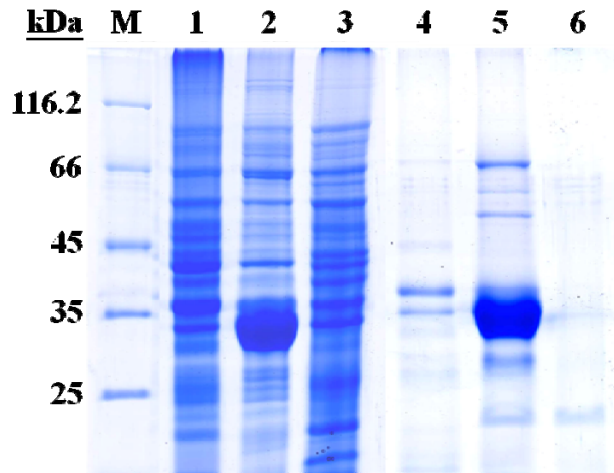


圖 7、pET30a-Eam-GFP 以 IPTG 誘導大量表現後之 SDS-PAGE

M 為蛋白質分子量標準溶液；1 為未以 IPTG 誘導之 BL21 pET30a-Eam-GFP 菌液，經由破菌、離心後的蛋白質沉澱；2 為以 IPTG 誘導之 BL21 pET30a-Eam-GFP 菌液，經由破菌、離心後的蛋白質沉澱；3 為以 IPTG 誘導之 BL21 pET30a 菌液，經由破菌、離心後的蛋白質沉澱，作為對照組 (negative control)；4 為未以 IPTG 誘導之 BL21 pET30a-Eam-GFP 菌液，經由破菌、離心後的蛋白質上清液；5 為以 IPTG 誘導之 BL21 pET30a-Eam-GFP 菌液，經由破菌、離心後的蛋白質上清液；6 為以 IPTG 誘導之 BL21 pET30a 菌液，經由破菌、離心後的蛋白質上清液，作為對照組。

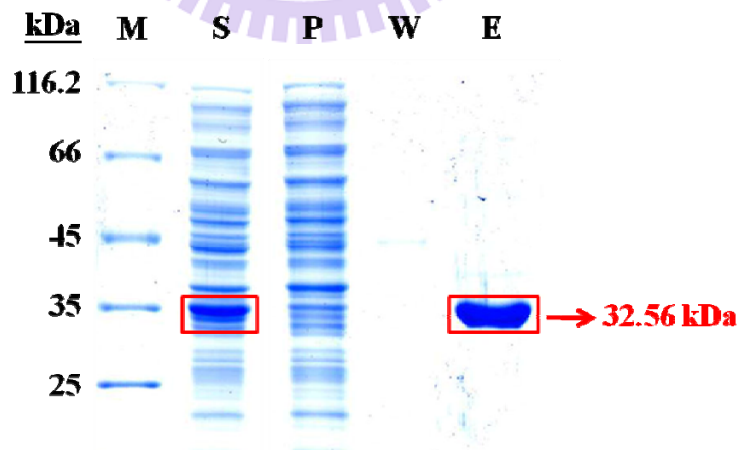


圖 8、pET30a-Eam-GFP 以 His-tag 管柱純化後之 SDS-PAGE

M 為蛋白質分子量標準溶液；S 為 BL21 pET30a-Eam-GFP 大量表現並破菌後之蛋白質上清液；P 為 BL21 pET30a-Eam-GFP 破菌後離心之蛋白質上清液，並流通過 His-tag 純化管柱之溶液；W 為清洗管柱內其於雜蛋白質過程中流下之溶液；E 為純化分離出的 GFP 純蛋白質。

### 壹-5-2 5 nm 羧酸化奈米鑽石 3D 螢光光譜

因先前研究顯示奈米鑽石具有特殊的螢光特性，於研究中可作為標記位置所用，故本實驗係用螢光光譜儀之三維(3D)全波段光譜作掃描，以檢測實驗所用之已羧酸化奈米鑽石的螢光訊號。

由實驗結果顯示(圖 9)，本研究所使用之羧酸化奈米鑽石並不具有連續螢光光譜之特性，故在使用上若追蹤其位置則必須於其上接合一帶有螢光之物質。

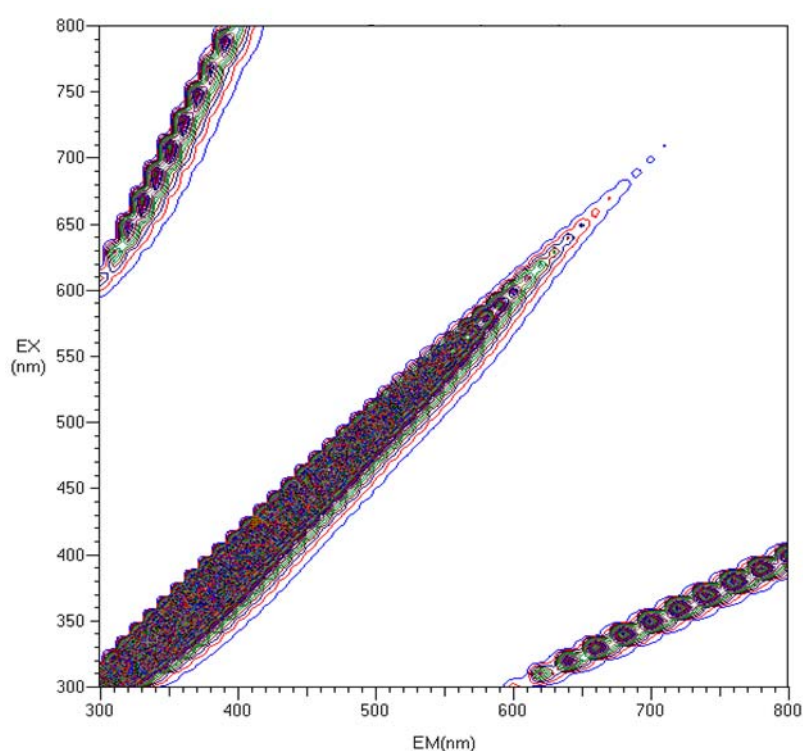


圖 9、以螢光儀觀察 5 nm 羧酸化奈米鑽石之 3D 螢光光譜圖

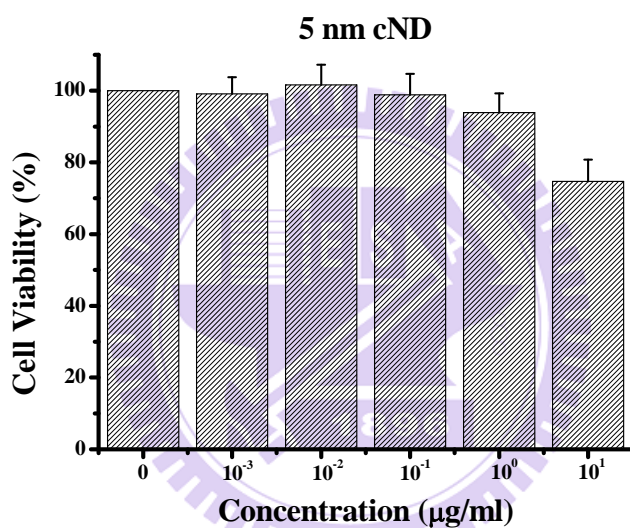
樣品為以二次水稀釋後，終濃度 0.1 mg/ml 之 5 nm 奈米鑽石；設定實驗條件：激發光 (EX) 波長範圍與發射光 (EM) 波長掃描範圍皆由 300 nm 至 800 nm；激發狹縫 (excitation slit) 與發射狹縫 (emission slit) 寬度皆為 5 nm；掃描速度為 30000 nm/min；光電倍增管通電電壓為 400V。

### 壹-5-3 5 nm cND、GHRBP 以及 pET30a-Eam-GFP 之細胞毒性測試

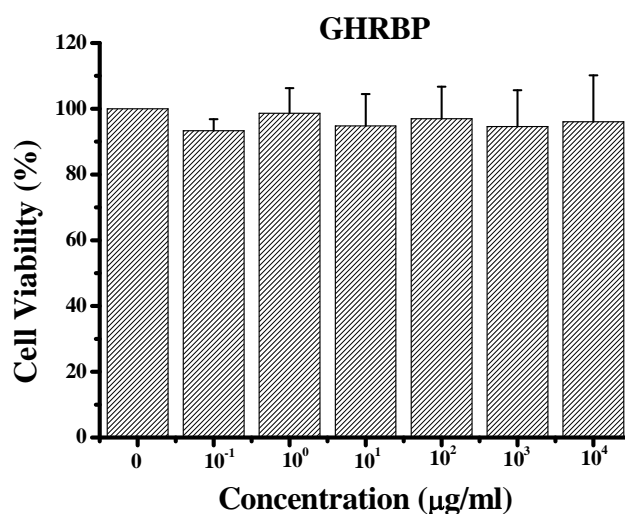
以 MTT 分別測試 5 nm 羧酸化奈米鑽石、重組生長激素受體結合蛋白以及綠螢光蛋白質之細胞毒性。由圖 10(A)之結果顯示，5 nm 羧酸化奈米鑽石於 1  $\mu\text{g/ml}$  濃度以下幾乎不影響細胞之活性；圖 10(B)中，生長激素受體結合蛋白除了不影響 A549 細胞之活性，也不會造成 A549 肺癌細胞之過度增生；圖 10(C)則為綠螢光蛋白之細胞存活率分析結果，其 pET30a-Eam-GFP 對於細胞並不具有細胞毒性。

依照上述結果，以細胞活性正常與否來作為實驗中各分子所使用之適當作用濃度的選擇依據：選定 5 nm cND、GHRBP 以及 pET30a-Eam-GFP 皆以濃度 1  $\mu\text{g/ml}$  為處理 A549 肺癌細胞之實驗條件。

(A)



(B)



(C)

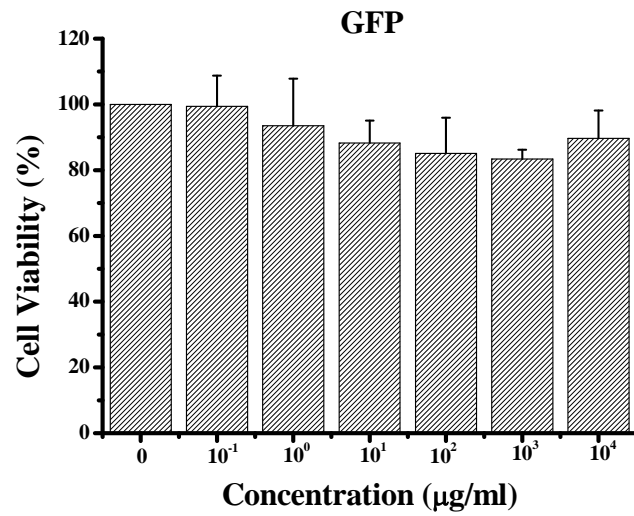


圖 10、利用 MTT 分別分析 cND、GHRBP、pET30a-Eam-GFP 對 A549 細胞之細胞毒性

以  $2 \times 10^4$  cells/well A549 細胞培養於 96 孔細胞培養盤內 24 小時，第二天分別以不同濃度之 5 nm cND、GHRBP、pET30a-Eam-GFP 處理細胞 24 小時，並以完全無處理之細胞為控制組，第三天以 MTT 試劑與微量孔盤分析儀分析細胞存活率(n 值=3)。其中，(A)、(B)、(C)圖分別顯示為 5 nm cND、GHRBP、pET30a-Eam-GFP 之分析結果，且橫軸為各分子處理 A549 細胞之濃度，縱軸表示細胞存活能力。



#### 壹-5-4 cND-GHRBP-GFP 複合體粒徑大小、構形分析，以及細胞毒性測試

利用化學方式，以 EDC 及 sulfo-NHS 接合 cND 與 GHRBP 及 GFP 後，針對產物必須做一些分析，以利後續實驗使用。故先使用原子力顯微鏡觀察 cND-GHRBP-GFP 複合體之形狀以及其均勻程度，以及動態光散射儀量測並計算其粒徑之大小。並以倒立螢光顯微鏡觀察明視野中之奈米鑽石與綠色螢光之綠螢光蛋白位置是否相對相同，此結果能做為接合成功與否以及約略判斷接合率之方式之一，另外，使用螢光光譜儀觀看接合完成之 cND-GHRBP-GFP 複合體是否表現綠螢光蛋白之螢光訊號。最後，利用 MTT 測試 cND-GHRBP-GFP 複合體於 A549 肺腺癌細胞中是否具有細胞毒性，又何濃度為最適用來處理細胞而不會因濃度過高，造成細胞內壓力而使得細胞不健康或死亡。

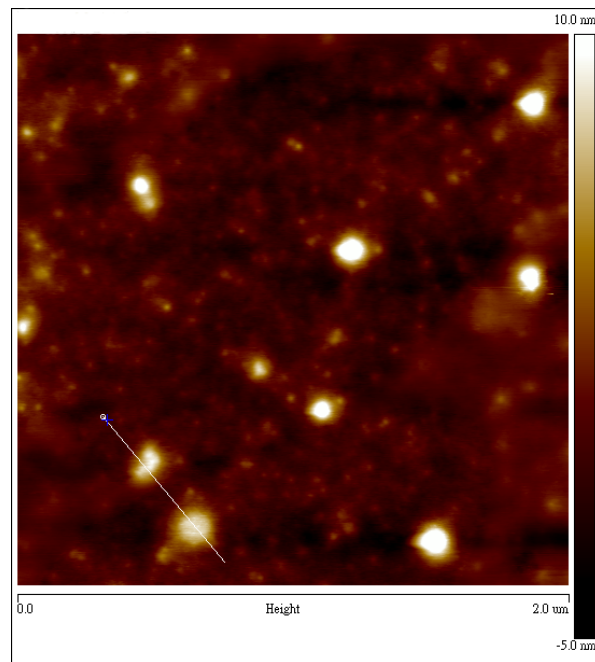
由圖 11 看出，灑於雲母片上之 cND-GHRBP-GFP 複合體樣品，幾乎呈現均勻分布於基質上的狀況，外形幾近於球型結構，且可由其顏色深淺來做初步判斷，cND-GHRBP-GFP 複合體之分子大小大約是 5 nm 至 15 nm 的範圍區間(圖 11(A))，由圖 11(B)可得粒子高度約 9 nm。而佐以動態光散射儀之結果，由圖 12 所示，cND-GHRBP-GFP 複合體之粒徑大小為  $9.30 \pm 0.16$  nm，正好落於原子力顯微鏡掃描所指之範圍內。

以螢光光譜儀分析結果如圖 13，綠色虛線為純化出的 pET30a-Eam-GFP 蛋白質，以 395 nm 之激發光做激發，可於 511 nm 處看見極強之螢光訊號，相對於此，依相同條件掃描 cND-GHRBP-GFP 複合體，同樣能在發射光範圍 511 nm 處看見螢光訊號，並在此處為最強，此結果顯示 cND-GHRBP-GFP 複合體之螢光訊號表現。

圖 14 以倒立螢光顯微鏡觀察 cND-GHRBP-GFP 複合體，灰色部分表示的是奈米鑽石的位置，而綠色螢光則對應綠螢光蛋白的位置，由圖 14(A)在大範圍的圖片當中可看出，cND-GHRBP-GFP 複合體容易聚集成小團簇，並且由圖 14(A)、(B)可大概估計，奈米鑽石與蛋白質之接合率大約有 50% 以上。

而在細胞毒性分析方面，序列稀釋 cND-GHRBP-GFP 複合體後，針對 A549 肺腺癌細胞以不同濃度之 cND-GHRBP-GFP 複合體分別處理 24 小時。由圖 15 MTT 之結果分析而得，cND-GHRBP-GFP 複合體在 100  $\mu\text{g/ml}$  濃度以下幾乎不影響細胞正常增殖之情況，可說是不具有生物毒性(排除高濃度造成的細胞壓力)，並且於本實驗中選定 10  $\mu\text{g/ml}$  來做為處理細胞與反應之條件。

(A)



(B)

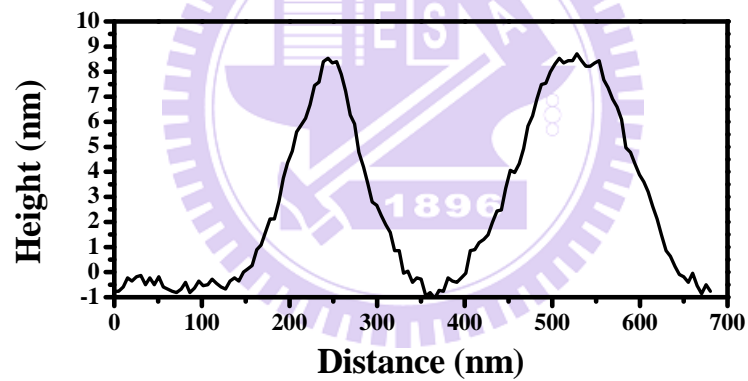


圖 11、以原子力顯微鏡觀察 cND-GHRBP-GFP 複合體

樣品為 cND-GHRBP-GFP 複合體乾燥後粉末平鋪於雲母片，掃描後分析出 cND-GHRBP-GFP 複合體之平均粒徑約為 5-15nm。圖(A)為原子力顯微鏡掃描影像，顏色愈量表粒子高度愈高；圖(B)為高度截面圖，橫軸表示寬度，縱軸表示高度。

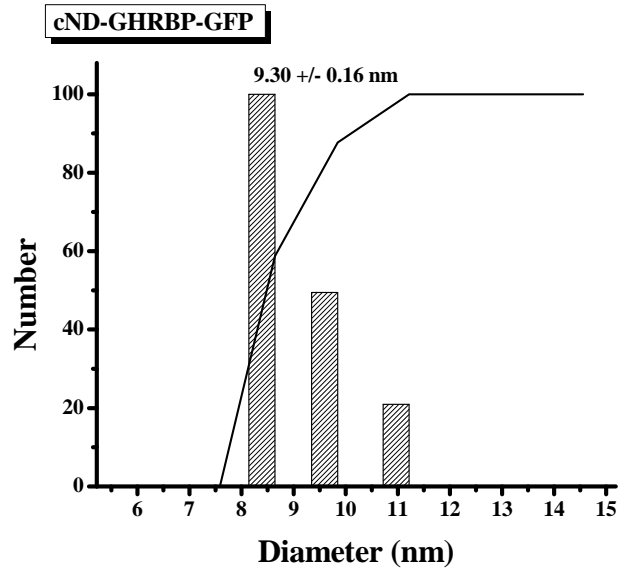


圖 12、以動態光散射儀量測 cND-GHRBP-GFP 複合體之平均粒徑大小

樣品為懸浮於二次水中的 cND-GHRBP-GFP 複合體，結果經由計算分析出 cND-GHRBP-GFP 複合體之平均粒徑為 9.3 nm。其中，黑色實線代表 cND-GHRBP-GFP 複合體累加百分比之數值。

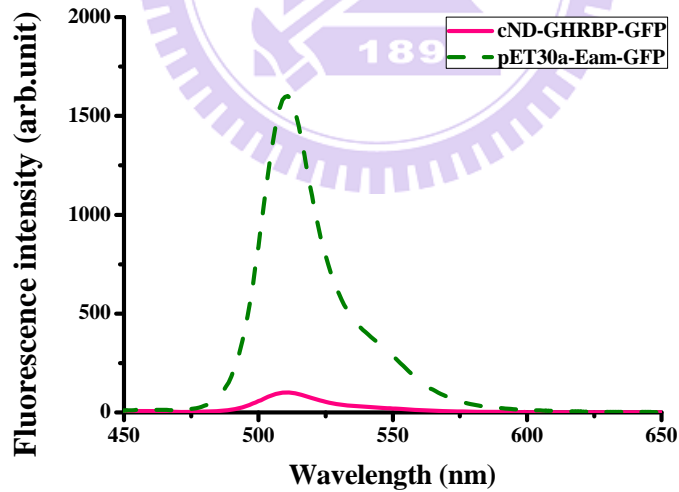


圖 13、利用螢光儀觀察 cND-GHRBP-GFP 複合體之螢光光譜圖

設定實驗條件：激發光 (excitation) 波長為 395 nm；發射光 (emission) 波長掃描範圍由 450 nm 至 800 nm；激發狹縫 (excitation slit) 與發射狹縫 (emission slit) 寬度皆為 5 nm；掃描速度為 12000 nm/min；光電倍增管通電電壓為 700V。橫軸為發射波長，縱軸為螢光強度。虛線 (dash) 表示經 His-tag 純化後之 pET30a-Eam-GFP 蛋白質螢光訊號；實線 (dot) 表示 cND-GHRBP-GFP 複合體之螢光訊號；放射波長 (emission) 範圍約於 475 nm 至 595 nm 間，且於  $E_m=511$  時有放射光最大值。

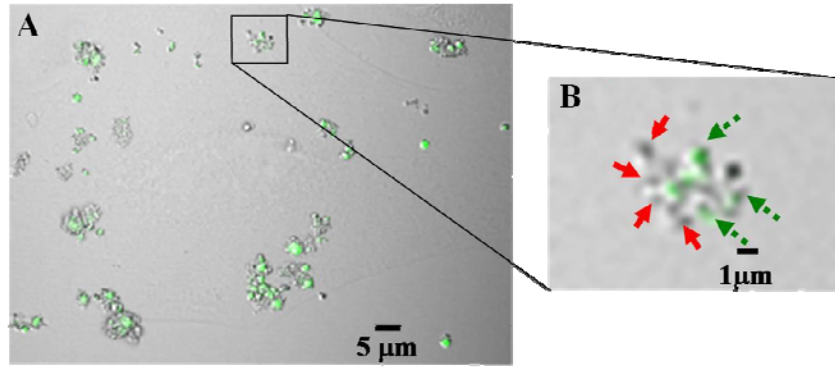


圖 14、以螢光顯微鏡觀察 cND-GHRBP-GFP 複合體

圖(a)為 cND-GHRBP-GFP 複合體散佈於載玻片上之情況。圖(b)中放大圖(a)其中一景，紅色箭頭指出奈米鑽石之位置；綠色箭頭指出 GFP 之位置。

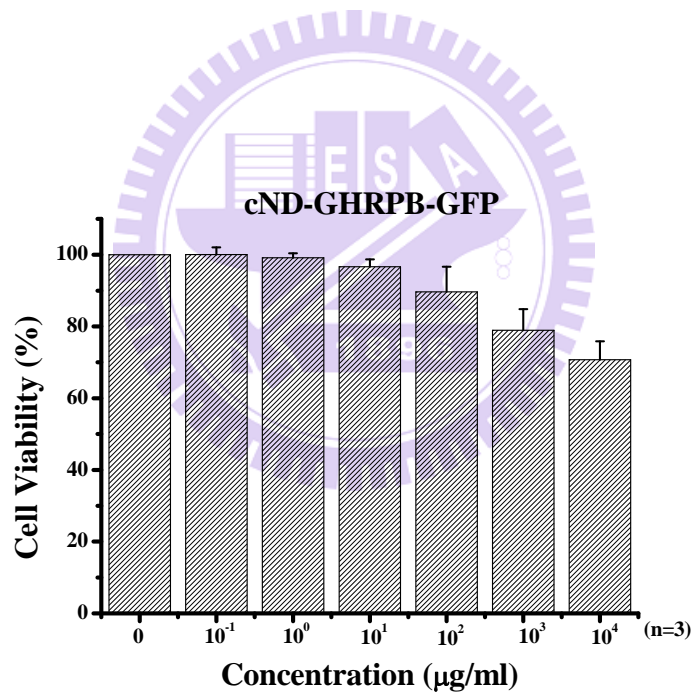


圖 15、利用 MTT 分析 cND-GHRBP-GFP 於 A549 細胞中之細胞毒性

以  $2 \times 10^4$  cells/well A549 細胞培養於 96 孔細胞培養盤內 24 小時，第二天分別以 0.1、1、10……10,000  $\mu\text{g/ml}$  cND-GHRBP-GFP 複合體處理細胞 24 小時，並以完全無處理之細胞為控制組，第三天以 MTT 試劑與微量孔盤分析儀分析細胞存活率(n 值=3)。

#### 壹-5-5 GHRBP 抗體的取得與效價分析

由免疫 BALB/c 小鼠後，抽取小鼠血液經過處理得到 GHRBP 之抗體，而後利用 ELISA 方式先測定此抗體之效價，並以西方墨點法分析此 mouse anti-rEaGH 抗體針對不同癌症細胞株內蛋白質及純 BSA 與 GHRBP 蛋白質是否具有專一辨識之效力。

圖 16 為 ELISA 測試抗體效價之結果，抗體在稀釋大約 400 倍後，其於 405 nm 之吸光值幾乎達飽和。而在抗體之專一性分析，由圖 17(A)可清楚看出，不同細胞株：小鼠淋巴結上皮細胞 SVEC4-10、人類乳癌細胞 MCF-7、人類大腸癌細胞 RKO、人類膀胱癌細胞 BFTC905、人類皮膚惡性黑色素瘤細胞 A375、人類非小細胞肺腺癌細胞 A549 內本身即無 rEaGH 之表現，而此抗體於上述細胞株皆不辨識任何蛋白；而在純 BSA 與純 rEaGH 中，可見其不辨認 BSA，而於大約 23 kDa 處有一條清楚的蛋白質訊號，且周圍幾乎無背景值。而圖 17(A)則為各蛋白質表現之 SDS-PAGE，作為一實驗對照組，確定各蛋白質之實驗條件，並確定其蛋白質存在。

由實驗結果(圖 17(B))可知，此 mouse anti-GHRBP 抗體具有專一性辨識 GHRBP 蛋白質之能力，並且於日後西方墨點法使用中，可以 1:10,000 倍稀釋作為實驗之適當條件，並且推估在細胞免液染色之實驗中，使用量約降低為西方墨點法所使用之 10 倍，即以 1:1,000 倍稀釋作為實驗條件。

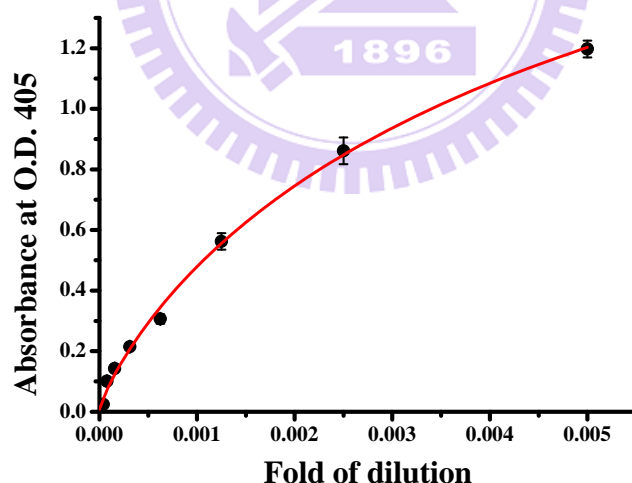
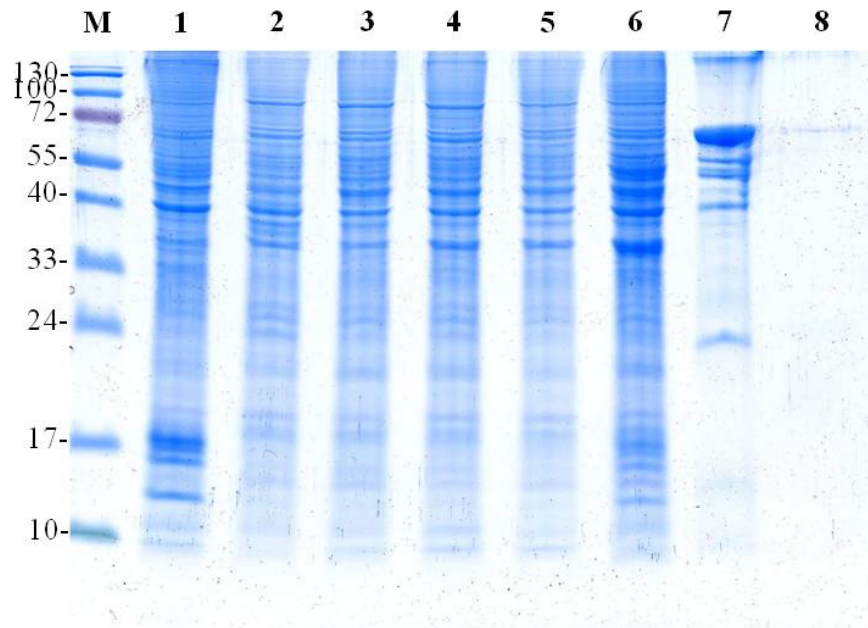


圖 16、 mouse anti-rEaGH 抗體效價測試結果

以 ELISA 測試免疫小鼠後取得之 rEaGH 抗體，橫軸代表 mouse anti-rEaGH 抗體稀釋之倍率，縱軸為以 ELISA reader 讀取 O.D. 405 之吸收光強度讀值。



(A)



(B)

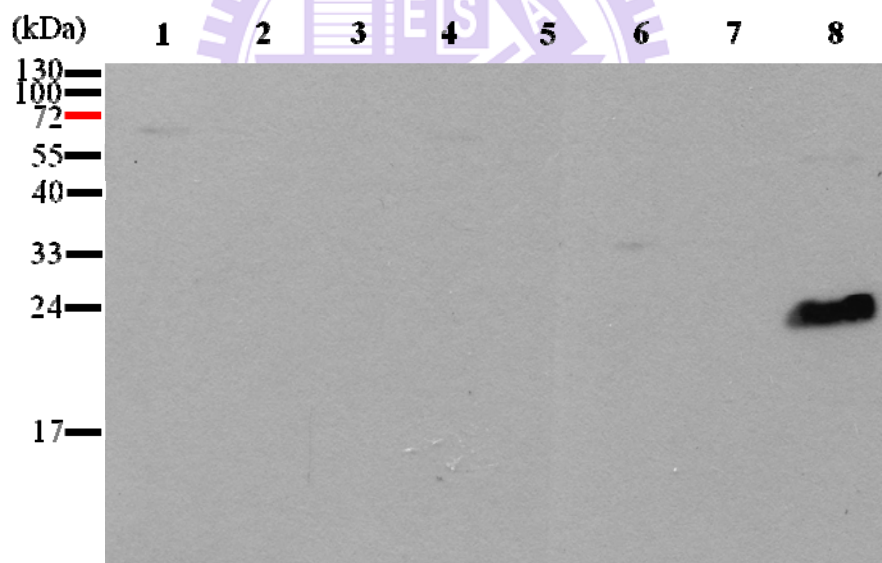


圖 17、以西方墨點法測試 mouse anti-rEaGH 抗體於不同之細胞株以及純 BSA 與 rEaGH 蛋白質之專一性

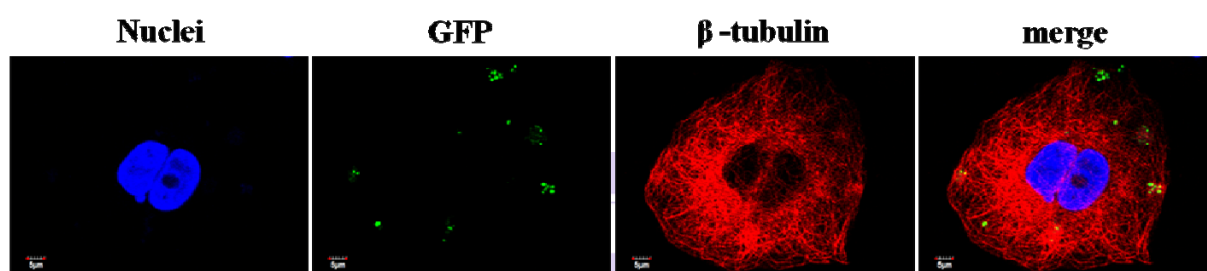
圖(A)、(B)中，M 表示蛋白質分子量標準溶液；1 為小鼠淋巴結上皮細胞 SVEC4-10 之細胞內總蛋白質；2 為人類乳癌細胞株 MCF-7 之細胞內總蛋白質；3 為人類大腸癌細胞株 RKO 之細胞內總蛋白質；4 為人類膀胱癌細胞株 BFTC905 之細胞內總蛋白質；5 為人類皮膚惡性黑色素瘤 A375 之細胞內總蛋白質；6 為人類非小細胞肺癌細胞株 A549 之細胞內總蛋白質；7 為純 BSA 蛋白質；8 為純 rEaGH 蛋白質。圖(A)為 SDS-PAGE 作為對照用；圖(B)為以西方墨點法分析之結果。

#### 壹-5-6 羧酸化奈米鑽石-生長激素-綠螢光蛋白複合體表現於 A549 細胞膜

在實驗設計中，奈米鑽石上面接合的生長激素受體結合蛋白質將會與 A549 肺腺癌細胞表面表現之生長激素受體專一性結合在一起。為了證實此論點，本實驗以 GFP 之綠色螢光標記整個 cND-GHRBP-GFP 複合體，將 A549 細胞處理 cND-GHRBP-GFP 複合體 0.5 小時之後，以 GFP 為標的，觀察 cND-GHRBP-GFP 複合體位於細胞內之位置。

由圖 18(A)之共軛焦顯微鏡影像看到，綠色螢光的訊號皆表現於細胞周圍細胞膜之位置，而圖 18(B)之 3D 橫向影像也同樣能夠看到上述現象。

(A)



(B)

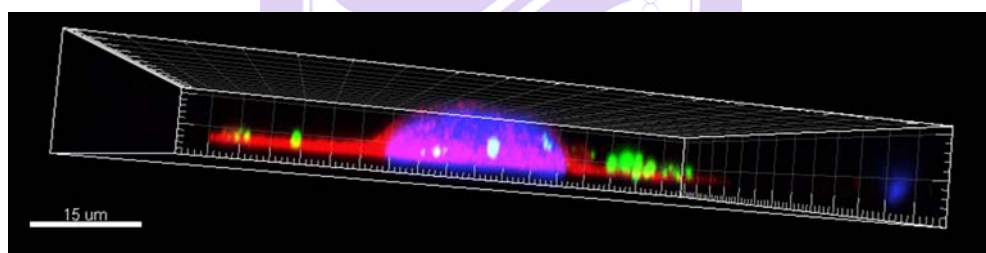


圖 18、cND-GHRBP-GFP 複合體於細胞內之共軛焦顯微鏡影像

使用免疫細胞化學染色以及共軛焦顯微鏡呈像拍攝，觀察 cND-GHRBP-GFP 複合體於細胞中位置。圖(A)中，綠色螢光為 GFP 被激發所得之螢光訊號；以 Cy3 之紅色螢光標記  $\beta$ -tubulin；Hoechst 33342 標記藍色螢光，表示細胞核所在；scale bar=5  $\mu$ m。圖(B)為以 Z 軸作斷面掃描，而後將組圖疊加為 3D 影像；scale bar=15  $\mu$ m。

壹-5-7 分別選定 5 mJ 與 30 mJ 作為 266 nm 以及 532 nm 奈秒脈衝雷射於癌細胞與 cND-GHRBP-GFP 之作用功率

於本實驗之策略中，利用奈米鑽石經由奈秒脈衝雷射之激發產生結構變化，致使奈米鑽石體積膨脹，利用拉曼光譜儀做進一步分析，比較經由不同激發波長、不同激發時間以及不同激發功率下，奈米鑽石之結構改變。

由圖 19 之拉曼圖譜顯示，在以 0.1 s/step 之 266 nm 雷射激發下，計算其 diamond band 與 G band 之比率。由奈米鑽石未經雷射激發組、經 20 mJ 雷射激發組、經 30 mJ 雷射激發組、經 40 mJ 雷射激發組，其比率分別為 1、0.917、0.916、0.887(表四)。此計算結果明顯指出隨著雷射功率越高，G band 量隨之上升(表示  $sp^2$  結構愈強)。

而在

圖 20 之拉曼圖譜結果顯示，利用 10 s/step 之 532 nm 雷射激發下，激發功率於 30 mJ 以上皆可以看見奈米鑽石結構中 G band 訊號被激發增加。經由計算 diamond band 與 G band 之比率，奈米鑽石未經雷射激發組、經 30 mJ 之雷射激發與經 50 mJ 雷射激發分別為 1、0.885、0.837(表四)，此表示其原有  $sp^3$  結構已轉變為  $sp^2$ ，並故選定以 10 s/step 且激發功率 30 mJ 之 532 nm 雷射作為實驗條件。



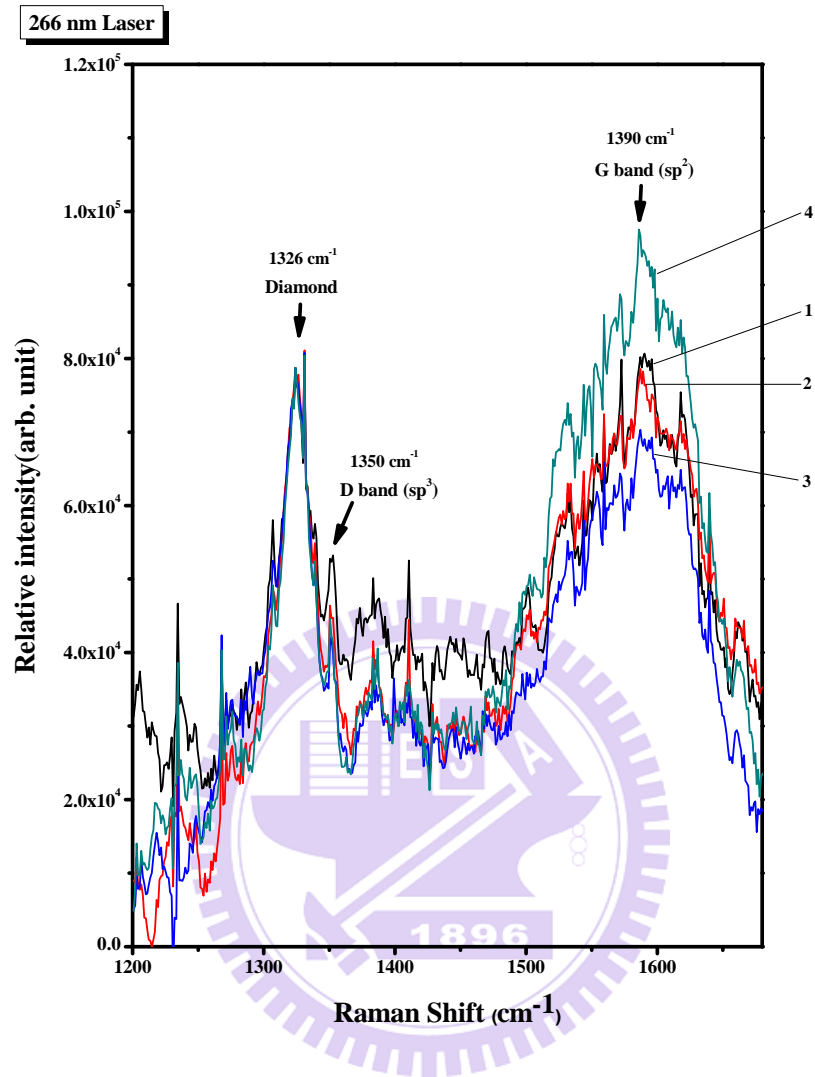


圖 19、經由 266 nm 雷射以 0.1 s/step 激發奈米鑽石之拉曼光譜圖

圖中，橫軸表示拉曼位移，縱軸表示訊號相對強度。1 表示不經雷射激發之奈米鑽石之拉曼訊號；2 表示以 20 mJ 之 266 nm 雷射作激發之訊號；3 表示以 30 mJ 之 266 nm 雷射作激發之訊號；4 表示以 40 mJ 之 266 nm 雷射作激發之訊號。

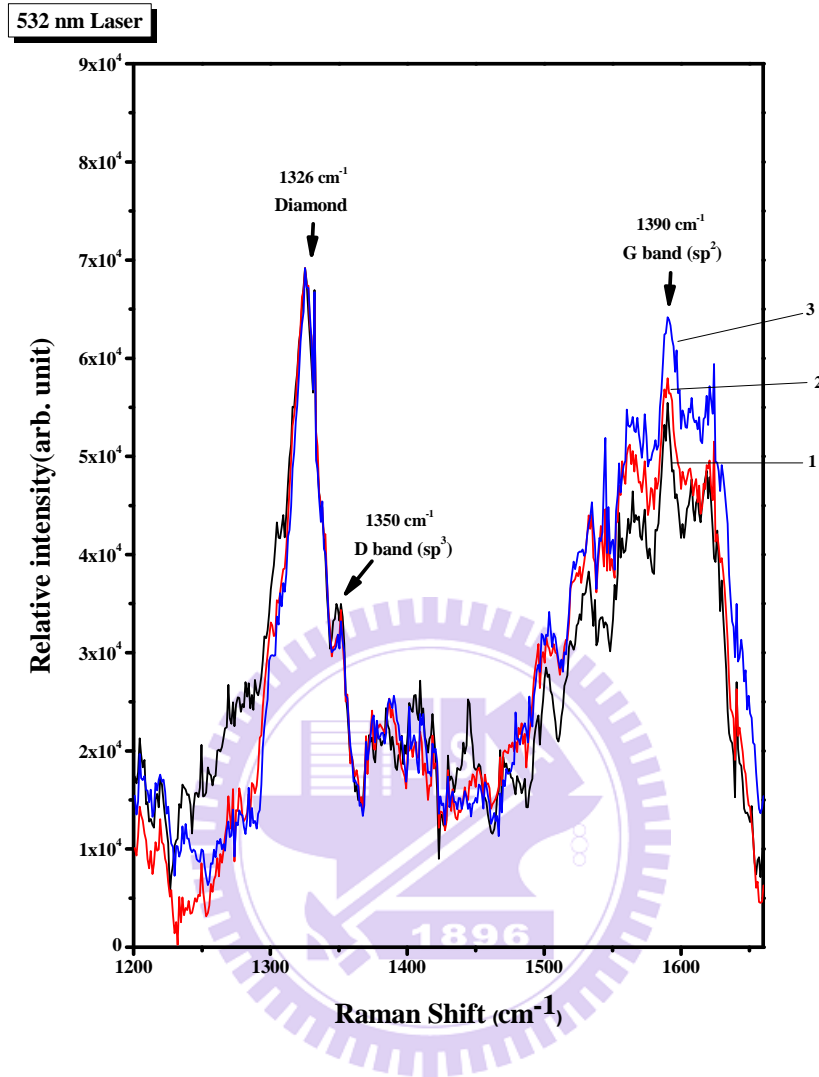


圖 20、經由 532 nm 雷射以 10 s/step 激發奈米鑽石之拉曼光譜圖

圖中，橫軸表示拉曼位移，縱軸表示訊號相對強度。1 表示不經雷射激發之奈米鑽石之拉曼訊號；2 表示以 30 mJ 之 532 nm 雷射作激發之訊號；3 表示以 50 mJ 之 532 nm 雷射作激發之訊號。

表四、不同波長激發後奈米鑽石之 diamond band 與 G band 拉曼光譜比率

功率	波長	266 nm	功率	波長	532 nm
0 mJ		1	0 mJ		1
20 mJ		0.917	30 mJ		0.885
30 mJ		0.916	50 mJ		0.837
40 mJ		0.887	-		-



壹-5-8 A549 肺腺癌細胞分別經由 266 nm 以及 532 nm 雷射激發後之細胞型態觀察與存活率分析

將 A549 肺腺癌細胞分別無處理以及處理 cND-GHRBP-GFP 複合體後，以 266 nm 及 532 nm 雷射作激發，觀察單純無處理 cND-GHRBP-GFP 複合體之細胞是否會受到雷射激發之影響而造成損傷或死亡；以及處理了 cND-GHRBP-GFP 複合體的細胞，再經由雷射激發後，是否會因為雷射對細胞內所含之 cND-GHRBP-GFP 複合體具有影響力，而使得細胞損傷或死亡。

藉由錐蟲藍將處理過後之細胞做染色，由圖 21 之螢光顯微鏡明視野之照片可明顯看出，經由 266 nm 雷射激發後之細胞，無論有無處理 cND-GHRBP-GFP 複合體，A549 肺腺癌細胞幾乎百分之百死亡；而在 532 nm 雷射激發下，無處理 cND-GHRBP-GFP 複合體之實驗組有少許細胞死亡，相對的，於處理了 cND-GHRBP-GFP 複合體之實驗組細胞有明顯死亡之跡象。而單純處理 cND-GHRBP-GFP 複合體而不以雷射激發之實驗組中，只看見少數之細胞死亡，與控制組之結果差別不大。

而後以錐蟲藍染色後之細胞作存活率分析，由圖 22 所示，於 266 nm 雷射激發之細胞 A549 肺腺癌細胞死亡率為百分之百，呼應了圖 21 之螢光顯微鏡明視野觀察之結果；而細胞單純處理 cND-GHRBP-GFP 複合體後之實驗組，細胞存活率達  $96.21 \pm 4.9\%$ ，與控制組相比下幾乎無差異。而 532 nm 雷射激發之數據中，同樣的，單純處理了 cND-GHRBP-GFP 複合體而不以雷射作激發之 A549 肺腺癌細胞之存活率也高達  $95.83 \pm 4.77\%$ ，與控制組相比下幾乎無差異；相對的，若單純以 532 nm 雷射激發下之細胞存活率會下降至  $79.16 \pm 4.77\%$ ，而輔以處理 cND-GHRBP-GFP 複合體之細胞存活率只剩  $20.31 \pm 3.12\%$ ，顯示 cND-GHRBP-GFP 複合體於此研究中之作用目的。

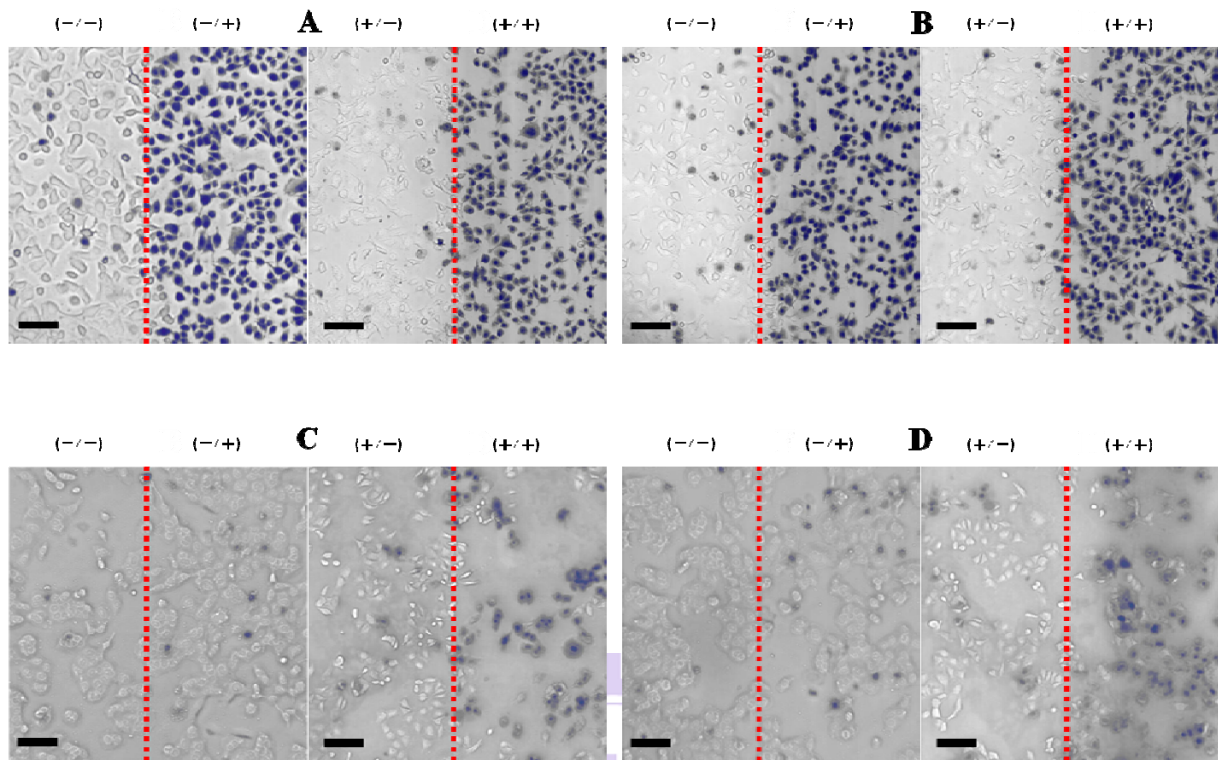


圖 21、A549 細胞經由處理 cND-GHRBP-GFP 複合體與雷射激發後之顯微明視野影像

以  $8 \times 10^5$  cells/well A549 細胞培養於 6 孔細胞培養盤內 24 小時，第二天將設計加有 cND-GHRBP-GFP 複合體之實驗組處理 0.5 小時，而後並分別以 5 mJ 且 0.1 s/step 之 266 nm 雷射以及 30 mJ 且 10 s/step 之 532 nm 雷射作激發，更換不含血清之 RPMI-1640 細胞培養液後，於  $37^\circ\text{C}$  恆溫培養箱中培養 24 小時。第三天以錐蟲藍做死細胞染色，並以倒立螢光顯微鏡之明視野觀察與拍照。圖中，紅色虛線表示有無雷射激發之分野；(-/-)表示無處理 cND-GHRBP-GFP 複合體也無雷射激發；(-/+)表示無處理 cND-GHRBP-GFP 複合體而以 266 nm 雷射激發；(+/-)表示處理 cND-GHRBP-GFP 複合體並且無雷射激發；(+/+)表示處理 cND-GHRBP-GFP 複合體同時以 266 nm 雷射激發。A 表示由 5 mJ 且 0.1 s/step 之 266 nm 雷射激發之實驗組；B 表示由 30 mJ 且 0.1 s/step 之 266 nm 雷射激發之實驗組；C 表示由 30 mJ 且 10 s/step 之 532 nm 雷射激發之實驗組；D 表示由 30 mJ 且 10 s/step 之 532 nm 雷射激發之實驗組。Scale bar=100  $\mu\text{m}$ 。

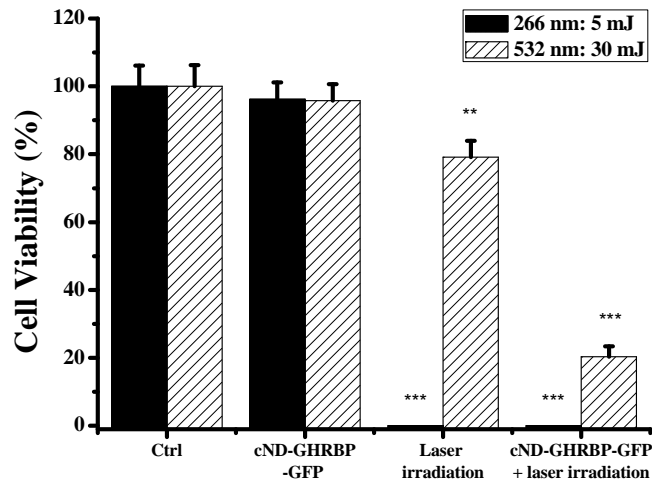


圖 22、細胞處理 cND-GHRBP-GFP 與雷射激發後之活性分析

以  $2 \times 10^4$  cells/well A549 細胞培養於 96 孔細胞培養盤內 24 小時，第二天分別將設計加有 cND-GHRBP-GFP 複合體之實驗組處理 0.5 小時，而後並分別以 5 mJ 且 0.1 s/step 之 266 nm 雷射以及 30 mJ 且 10 s/step 之 532 nm 雷射作激發，更換不含血清之 RPMI-1640 細胞培養液後，於 37°C 恆溫培養箱中培養 24 小時。第三天以錐蟲藍做死細胞染色後，以倒立螢光顯微鏡之明視野觀察同時計數活細胞之數量，而後分析細胞存活率。■ 表示以 5 mJ 且 0.1 s/step 之 266 nm 雷射作為激發條件；▨ 表示以 30 mJ 且 10 s/step 之 532 nm 雷射作為激發條件(n 值=3; \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001)。

壹-5-9 cND-GHRBP-GFP 複合體經由雷射激發後對於大量表現生長激素受體之 A549 肺腺癌細胞選擇性抑制細胞增殖能力

於本實驗中，為了鑑別 cND-GHRBP-GFP 複合體是否對於 A549 這株生長激素受體高度表現之癌症細胞株具有專一性結合，以及對於完全不表現生長激素受體之人類肺細胞 HFL-1 之生長有何影響，故以 cND-GHRBP-GFP 複合體處理 A549 肺腺癌細胞並使雷射激發後，利用 MTT 分析細胞之存活率。

於西方墨點法之實驗結果圖 23 清楚顯示，在 A549 肺腺癌細胞中含有生長激素受體之表現，而於一般正常之人類肺細胞 HFL-1 中則無表達生長激素受體。再者，以 MTT 測試後分析，如圖 24 明顯看出，無論是 A549 或是 HFL-1，在控制組細胞(無處理 cND-GHRBP-GFP 複合體也無雷射激發)、以 cND-GHRBP-GFP 複合體處理但不使用雷射激發之實驗組、無處理 cND-GHRBP-GFP 複合體但以 532 nm 雷射激發之實驗組之細胞存活率皆不受影響；相對於此，在 A549 細胞之結果中，事先處理經 cND-GHRBP-GFP 複合體後再由 532 nm 雷射激發，會使得 A549 細胞之細胞存活率明顯下降，而 HFL-1 則完全不受 cND-GHRBP-GFP 複合體與 532 nm 雷射激發合併作用之影響，還保有正常之細胞增殖能力。



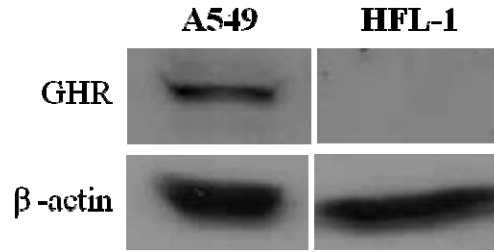


圖 23、以西方墨點法分析肺癌細胞株 A549 與正常肺細胞株 HFL-1 內之生長激素受體表現

β-Actin 作為內部控制組(internal control)，A549 為人類非小細胞肺腺癌細胞株，HFL-1 為正常人類肺細胞。

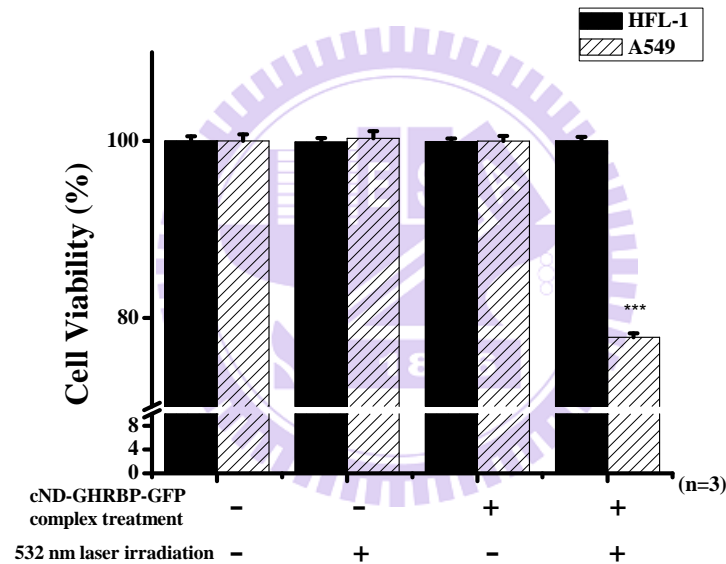


圖 24、以 cND-GFRBP-GFP 複合體處理細胞以及 532 nm 雷射誘導後細胞存活率之分析

利用 MTT 法分析有無處理 cND-GFRBP-GFP 複合體、有無受 532 nm 雷射激發及合併處理 cND-GFRBP-GFP 複合體與 532 nm 雷射激發之細胞存活率。以  $2 \times 10^4$  cells/well A549 以及 HFL-1 細胞培養於 96 孔細胞培養盤 24 小時，第二天將欲處理 cND-GFRBP-GFP 複合體之實驗組加入 10  $\mu$ g/ml cND-GFRBP-GFP 複合體，處理細胞 0.5 小時之後更換無血清之細胞培養液，再以 532 nm 雷射作激發並更換新的無血清細胞培養液，置於 37°C 培養 24 小時。第三天以 MTT 試劑與微量孔盤分析儀分析細胞存活率，並以單純加有細胞培養液之細胞為控制組。■ 表示以 532 nm 雷射激發正常人類肺細胞 HFL-1 之結果；▨ 表示以 532 nm 雷射激發人類非顯細胞肺腺癌細胞株 A549 之結果(n 值=3；\*\*\*p<0.001)。



壹-5-10 分別以 266 nm 與 532 nm 雷射激發後觀察 A549 細胞中細胞發炎因子 COX-2 之表現

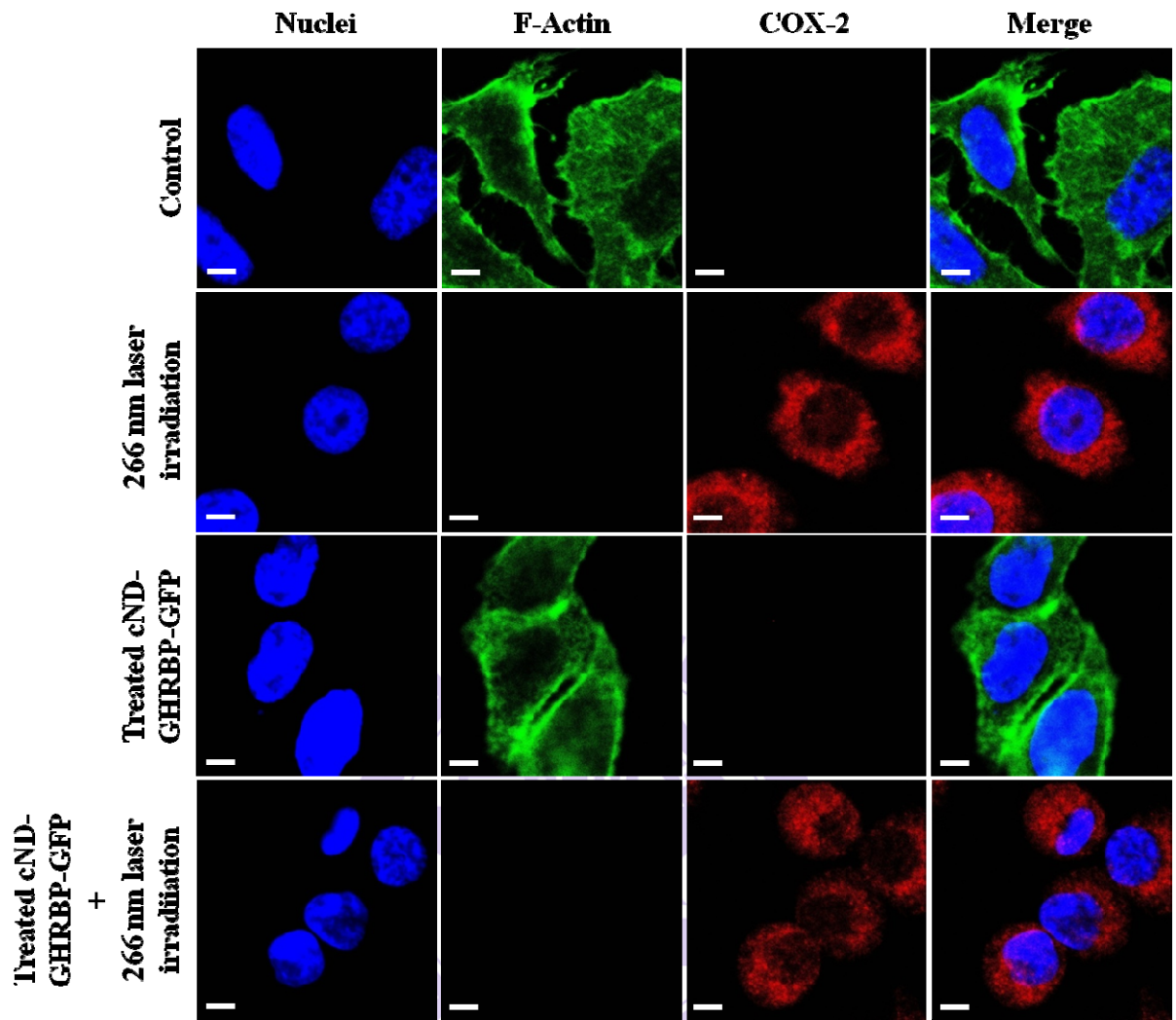
通常在細胞受到外來壓力使細胞短時間內損壞並造成細胞壞死時，細胞內的 NF- $\kappa$ B 會誘導細胞核內之 cox-2 基因大量轉譯出 COX-2 蛋白質，而此時 COX-2 蛋白質又為觀察細胞發炎反應其中之一之指標蛋白，細胞發炎反應的發生同時也意味著細胞已走向細胞壞死路徑而死亡。

故以 266 nm 多光子雷射與 532 nm 雙光子雷射分別激發無處理 cND-GHRBP-GFP 複合體之細胞及處理 cND-GHRBP-GFP 複合體之細胞後，以免疫細胞化學染色法針對細胞內之 COX-2 做染色，並以共軛焦顯微鏡觀察 COX-2 被誘導之情況以及比較其表現量。

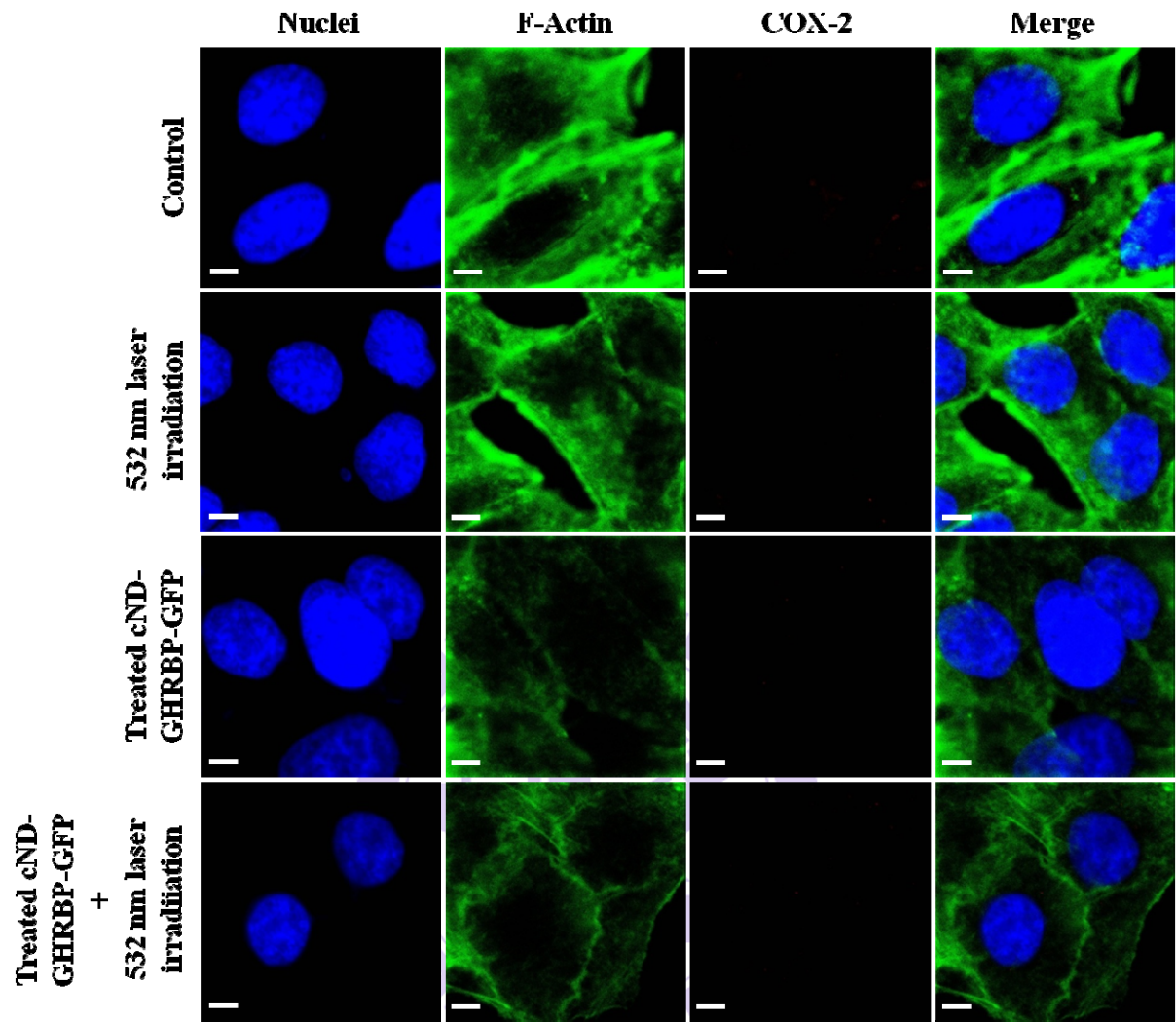
由圖 25 顯示，無論 A549 肺腺癌細胞有、無處理 cND-GHRBP-GFP 複合體，只要以 266 nm 雷射激發後，細胞皆會大量表現發炎相關蛋白 COX-2 於細胞質中；而控制組以及單純處理 cND-GHRBP-GFP 複合體之 A549 肺腺癌細胞皆無 COX-2 蛋白之表現(圖 25(A))。而相同實驗條件組，改以 532 nm 波長之雷射作為激發細胞之條件下，則可看出控制組與各實驗組織細胞皆不會有 COX-2 蛋白之表達(圖 25(B))；相同之結果也顯現於細胞凋亡正向反應之藥物-歐洲紫杉醇處理後的 A549 細胞中(圖 25(C))。



(A)



(B)



(C)

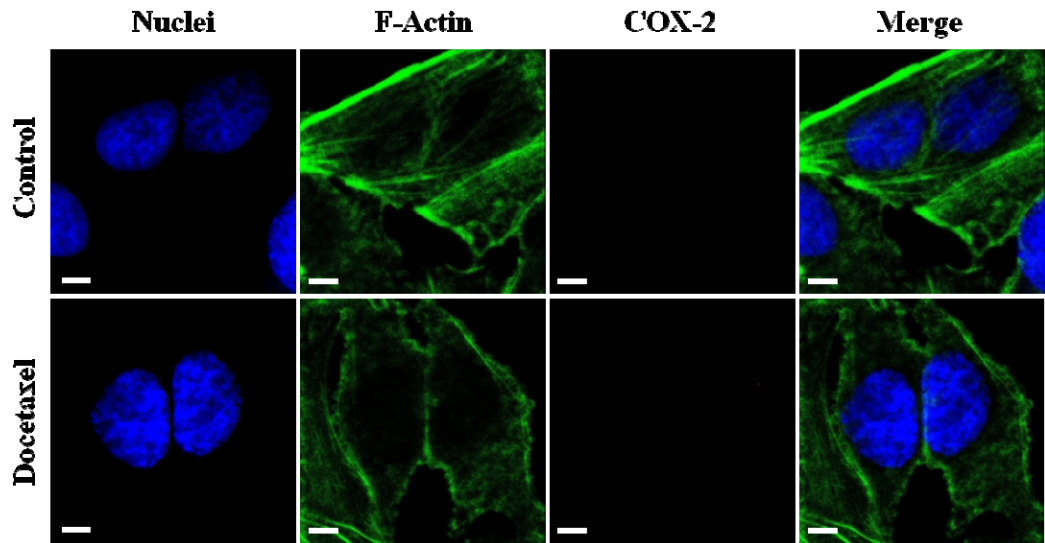


圖 25、以 266 nm 與 532 nm 雷射激發及歐洲紫杉醇處理後，A549 細胞中細胞發炎因子 COX-2 之表現

A549 細胞以  $5 \times 10^5$  cells/well 種入 6 孔細胞培養盤中，於  $37^\circ\text{C}$  細胞恆溫培養箱中培養 24 小時；第二天以  $10 \mu\text{g/ml}$  之 cND-GHRBP-GFP 複合體處理細胞 0.5 小時後移除細胞培養液，並以波長 266 nm 雷射激發，而後更換無血清之 RPMI-1640 細胞培養液，並且於  $37^\circ\text{C}$  細胞恆溫培養箱中重新培養 24 小時；另外，以  $20 \text{ nM}$  之歐洲紫杉醇處理細胞 24 小時。之後以免疫細胞染色法針對細胞核、細胞骨架 F-actin 與 COX-2 蛋白質作專一染色。如圖所示，Hoechst 33342 之藍色螢光訊號用以標記細胞核之位置；anti-mouse F-actin conjugate phalloidin 之綠色螢光訊號用以標記細胞骨架 F-actin 之位置；goat anti-mouse conjugate Cy3 表現之紅色螢光訊號表示 COX-2 蛋白質之表達與其位置；Merge 為細胞核、細胞骨架 F-actin 以及 COX-2 蛋白質重疊之螢光影像，用以判斷前述三者之相對位置。(scale bar= $5 \mu\text{m}$ )

壹-5-11 以 266 nm 與 532 nm 雷射激發後觀察 A549 細胞中 caspase-3 之表現

細胞接受一些死亡訊息後，可能會啟動細胞凋亡路徑，促使細胞凋亡蛋白 caspase-3 (pro-caspase-3) 被活化為活化態之 caspase-3 (active caspase-3)，再進一步使細胞凋亡路徑之下游蛋白質接以作用，又因為 caspase-3 為細胞凋亡路徑中下游之蛋白，再確認此蛋白質之作用後通常即可確認細胞之死亡走向細胞凋亡之路徑。

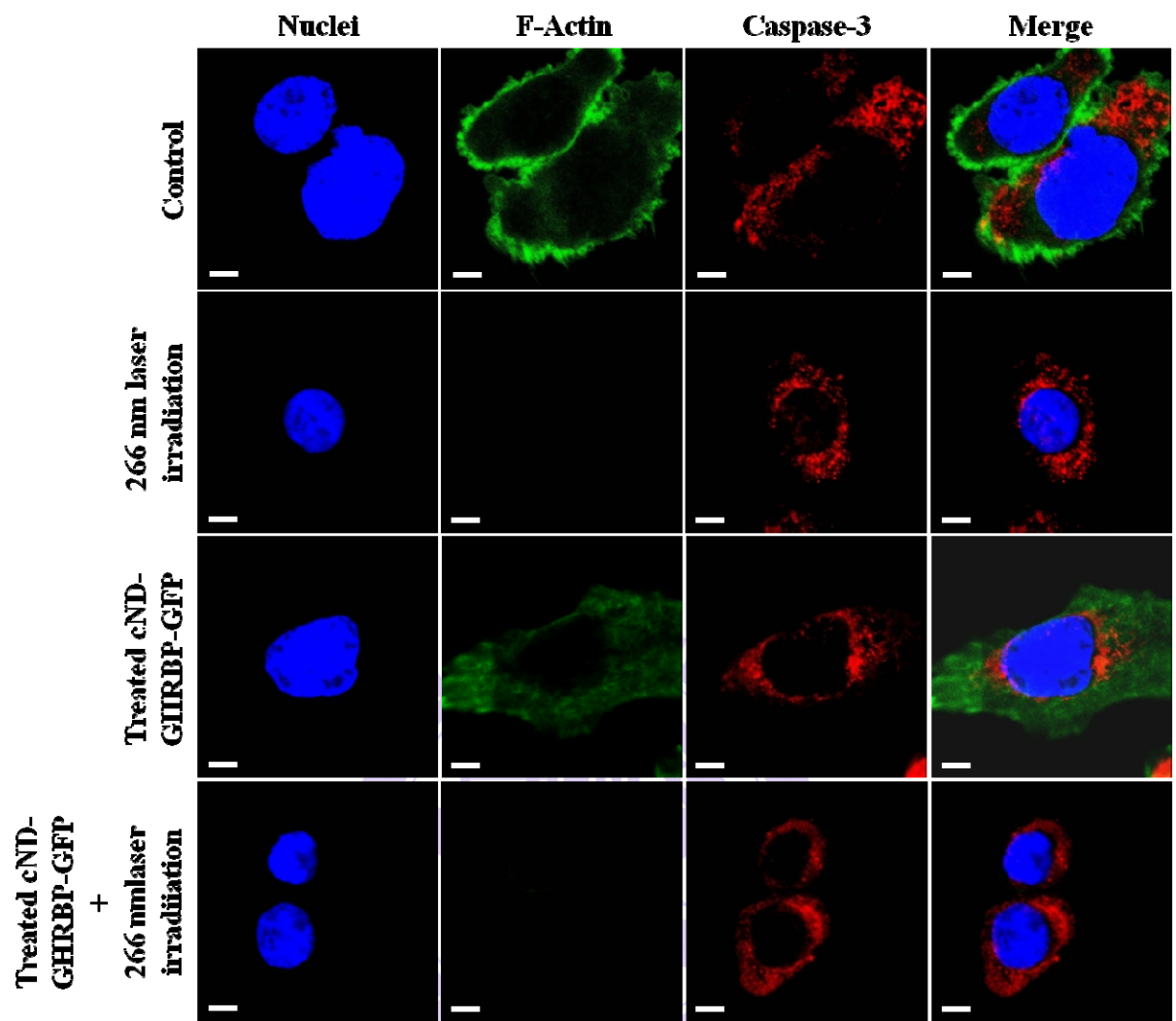
故以 266 nm 多光子雷射與 532 nm 雙光子雷射分別激發無處理 cND-GHRBP-GFP 複合體之細胞及處理 cND-GHRBP-GFP 複合體之細胞後，以免疫細胞化學染色法針對細胞內之 caspase-3 做染色，並以共軛焦顯微鏡觀察被誘導活化之 caspase-3 之情況。

在 266 nm 雷射條件背景下之實驗組中(圖 26(A))可觀察到，有、無處理 cND-GHRBP-GFP 複合體及有、無經由 266 nm 雷射激發之細胞中，細胞凋亡蛋白 caspase-3 之表現量皆無太大之變化。而在波長 532 nm 之雷射激發條件下，單純以 532 nm 雷射激發 A549 細胞之實驗組以及單純處理 cND-GHRBP-GFP 複合體之細胞，其細胞內 caspase-3 之表現量相對於控制組無明顯變化，但是細胞處理了 cND-GHRBP-GFP 複合體更輔以 532 nm 雷射激發，會造成細胞內 caspase-3 蛋白質表現量增加，且於細胞核內也看見其明顯表現(圖 26(B))。於圖 26(C)中，以濃度 20 nM 之歐洲紫杉醇處理 A549 細胞作為細胞凋亡正向控制組，也清楚看見 caspase-3 之高度活化、表現。

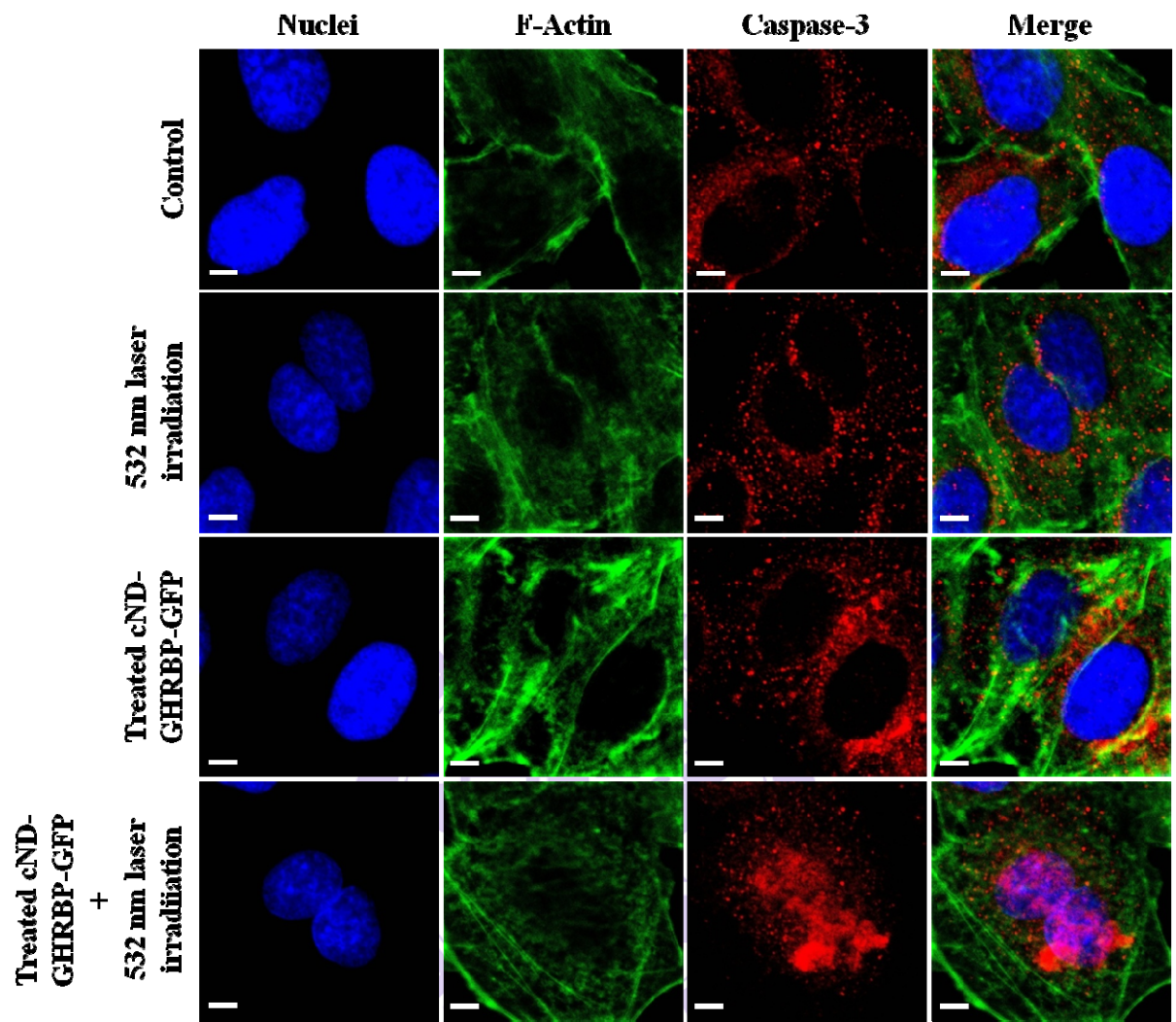




(A)



(B)



(C)

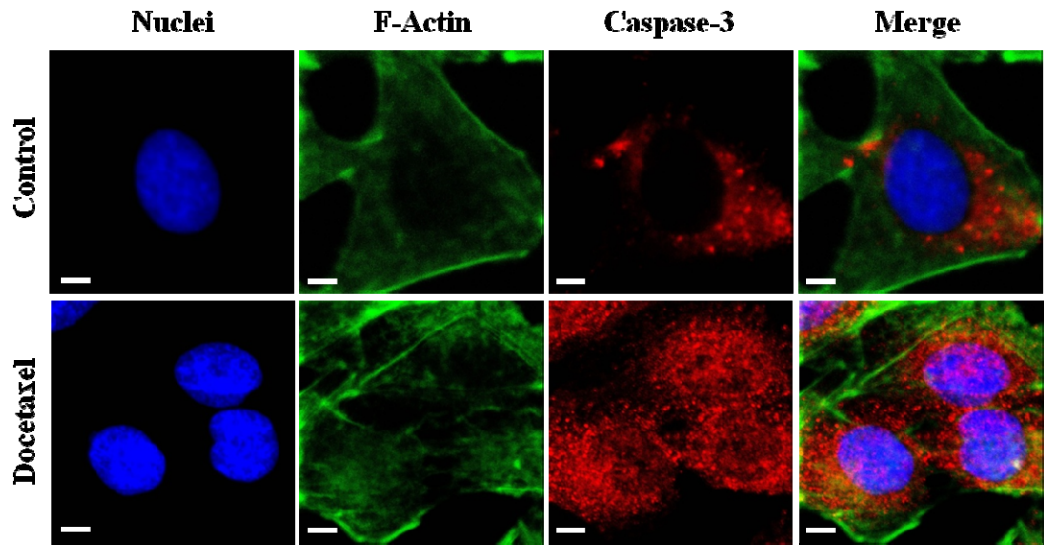


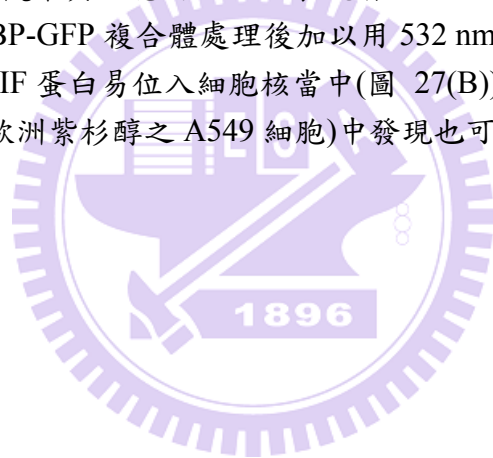
圖 26、266 nm 與 532 nm 雷射激發及歐洲紫杉醇處理後，A549 細胞中細胞凋亡蛋白質 caspase-3 之表現

A549 細胞以  $5 \times 10^5$  cells/well 種入 6 孔細胞培養盤中，於  $37^\circ\text{C}$  細胞恆溫培養箱中培養 24 小時；第二天以  $10 \mu\text{g/ml}$  之 cND-GHRBP-GFP 複合體處理細胞 0.5 小時後移除細胞培養液，並以波長 266 nm 雷射激發，而後更換無血清之 RPMI-1640 細胞培養液，並且於  $37^\circ\text{C}$  細胞恆溫培養箱中重新培養 24 小時；另外，以  $20 \text{ nM}$  之歐洲紫杉醇處理細胞 24 小時。之後以免疫細胞染色法針對細胞核、細胞骨架 F-actin 與 caspase-3 蛋白質作專一染色。如圖所示，Hoechst 33342 之藍色螢光訊號用以標記細胞核之位置；anti-mouse F-actin conjugate phalloidin 之綠色螢光訊號用以標記細胞骨架 F-actin 之位置；goat anti-mouse conjugate Cy3 表現之紅色螢光訊號表示 caspase-3 蛋白質之表達與其位置；Merge 為細胞核、細胞骨架 F-actin 以及 caspase-3 蛋白質重疊之螢光影像，用以判斷前述三者之相對位置。(scale bar=5  $\mu\text{m}$ )

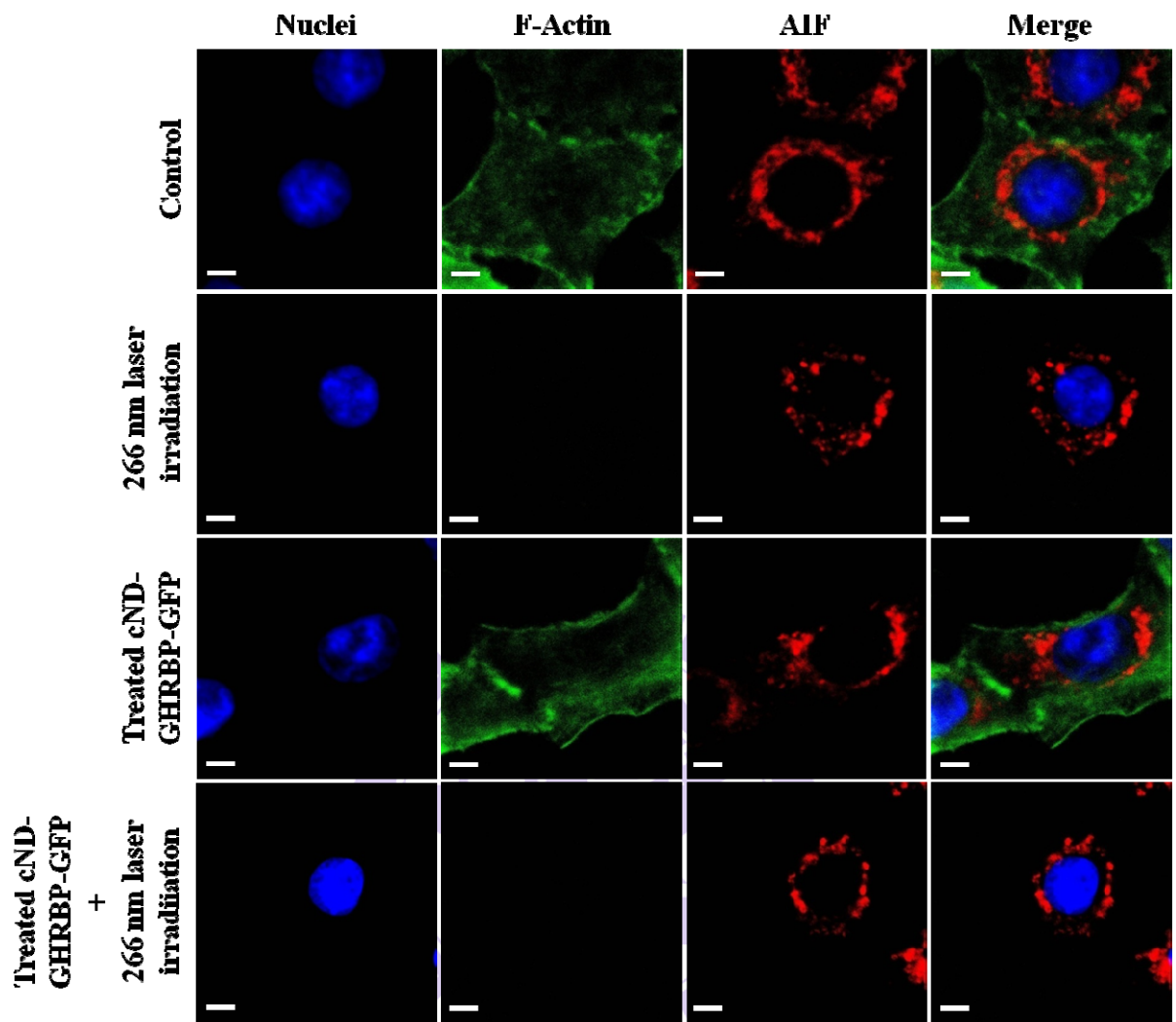
壹-5-12 以 266 nm、532 nm 雷射激發後觀察 A549 細胞中細胞凋亡誘導因子 AIF 之表現

在細胞凋亡路徑中，又細分為 caspase-dependent 以及 caspase-independent 兩種路徑，在結果 5-11 中為針對 caspase-dependent 路徑中的 caspase-3 蛋白質作觀察，而此部分結果則偵測 caspase-independent 中之細胞凋亡誘導因子 AIF 表現情況。於 caspase-independent 路徑中，AIF 扮演主要作用之角色，其原先存在於細胞之粒線體內，當其被細胞凋亡之訊號啟動後，會被誘導由粒線體中易位至細胞核中，故以 266 nm 多光子雷射與 532 nm 雙光子雷射分別激發無處理 cND-GHRBP-GFP 複合體之細胞及處理 cND-GHRBP-GFP 複合體之細胞後，以免疫細胞化學染色法針對細胞內之 AIF 做染色，並以共軛焦顯微鏡觀察 AIF 被誘導後易位至細胞核內之情況。

由圖 27 顯示，單純以 cND-GHRBP-GFP 複合體處理後之細胞，其細胞內的 AIF 與控制組比對皆位於細胞質之位置，而以 266 nm 雷射激發之實驗組及加入 cND-GHRBP-GFP 複合體處理後再以 266 nm 雷射激發之實驗組，其細胞內之 AIF 也與控制組相同，位於細胞質中(圖 27(A))。在相同的實驗組下，以波長 532 nm 之雷射作為激發光源條件，由處理 cND-GHRBP-GFP 複合體之實驗組、單純以 532 nm 雷射激發細胞之實驗組以及控制組，觀察其細胞內 AIF 之表現皆位於細胞質內，且表現量相差不多；但是在以 cND-GHRBP-GFP 複合體處理後加以用 532 nm 雷射激發 A549 細胞，可以明顯看見細胞質中的 AIF 蛋白易位入細胞核當中(圖 27(B))；相同之結果於細胞凋亡正向控制組(處理 20 nM 歐洲紫杉醇之 A549 細胞)中發現也可清楚的觀察(圖 27(C))。

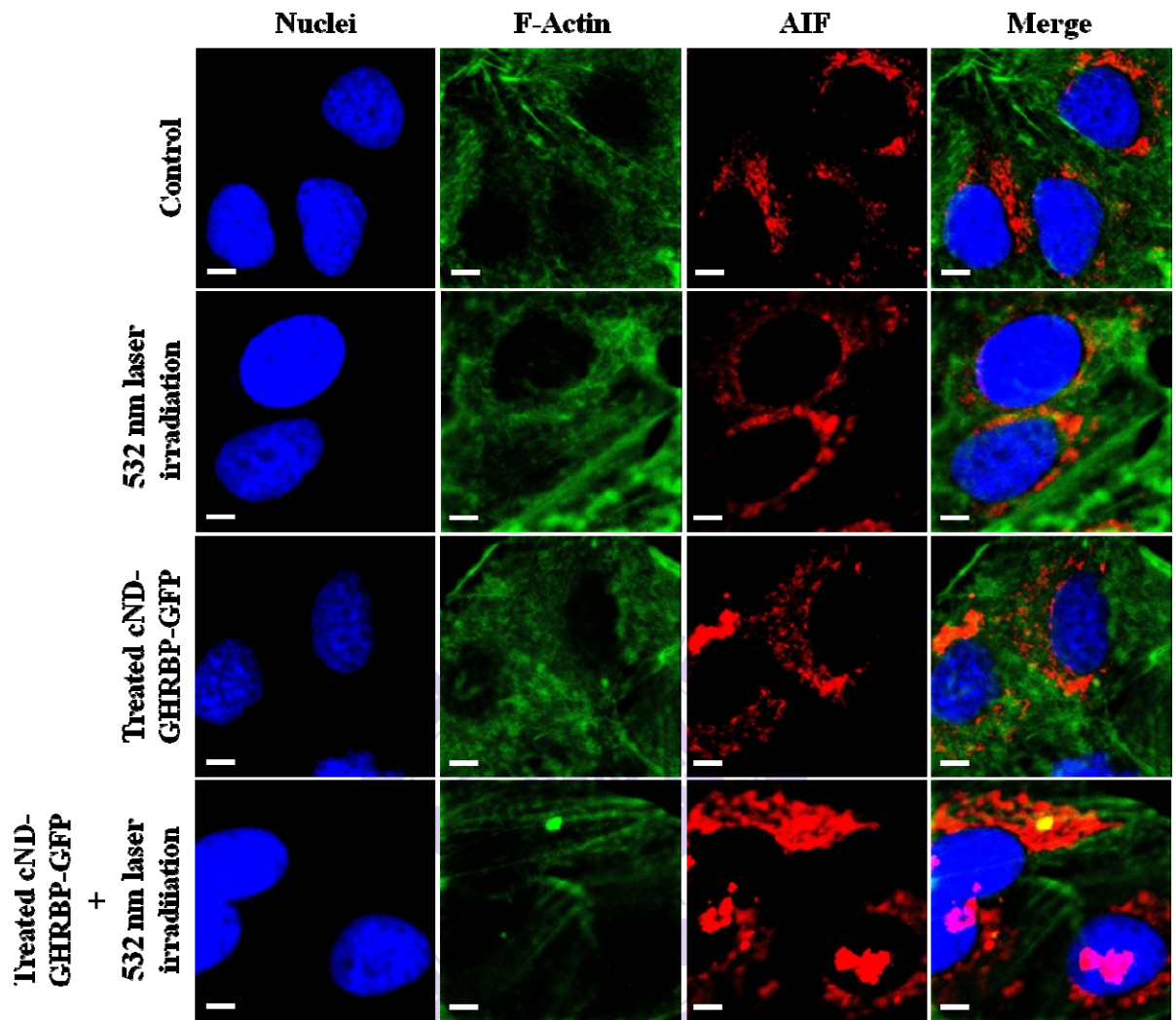


(A)





(B)



(C)

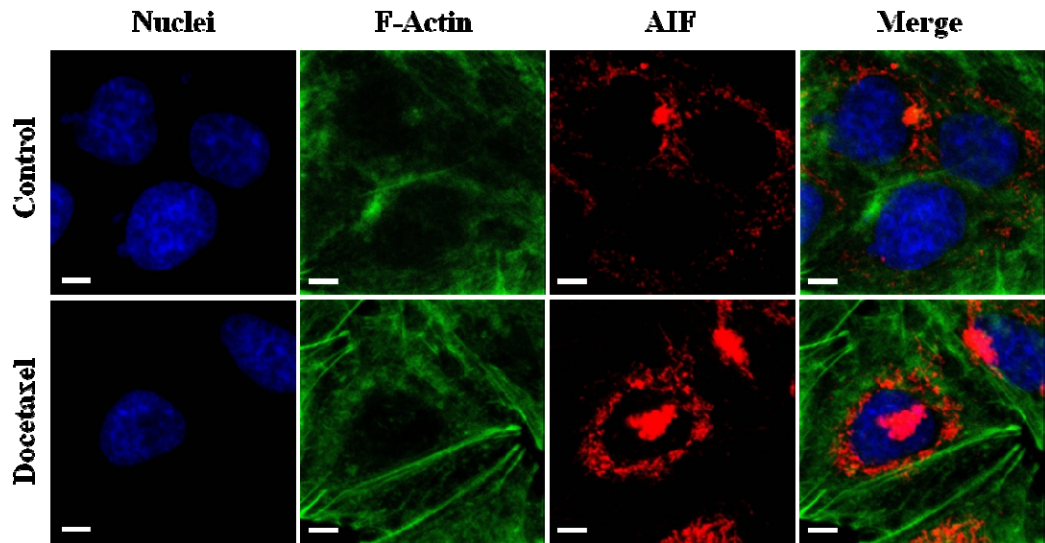


圖 27、以 266 nm 與 532 nm 雷射激發及歐洲紫杉醇處理後，A549 細胞中細胞凋亡誘導因子 AIF 之表現

A549 細胞以  $5 \times 10^5$  cells/well 種入 6 孔細胞培養盤中，於  $37^\circ\text{C}$  細胞恆溫培養箱中培養 24 小時；第二天以  $10 \mu\text{g/ml}$  之 cND-GHRBP-GFP 複合體處理細胞 0.5 小時後移除細胞培養液，並以波長 266 nm 雷射激發，而後更換無血清之 RPMI-1640 細胞培養液，並且於  $37^\circ\text{C}$  細胞恆溫培養箱中重新培養 24 小時；另外，以  $20 \text{ nM}$  之歐洲紫杉醇處理細胞 24 小時。之後以免疫細胞染色法針對細胞核、細胞骨架 F-actin 與 AIF 蛋白質作專一染色。如圖所示，Hoechst 33342 之藍色螢光訊號用以標記細胞核之位置；anti-mouse F-actin conjugate phalloidin 之綠色螢光訊號用以標記細胞骨架 F-actin 之位置；goat anti-mouse conjugate Cy3 表現之紅色螢光訊號表示 AIF 蛋白質之表達與其位置；Merge 為細胞核、細胞骨架 F-actin 以及 AIF 蛋白質重疊之螢光影像，用以判斷前述三者之相對位置。(scale bar= $5 \mu\text{m}$ )

### 壹-5-13 大量表現生長激素受體之細胞株

在此研究中，係先以已知含有大量生長激素受體之癌症細胞株 A549 作為 *in situ* 實驗中的模式細胞，又當日後發展此系統運作時，可針對不同之癌症細胞中相同有大量表達生長激素受體者來進行研究，故利用西方墨點法測試目前可得之癌症細胞株，觀察期內是否表現生長激素受體，以及相對表現量如何。

本次實驗針對四種不同之癌症細胞株，分別有：人類非小細胞肺腺癌細胞株 A549、人類肝癌細胞株 HepG2、人類子宮頸癌細胞株 HeLa 及人類乳癌細胞株 MCF-7，以西方墨點法作測試。結果如圖 28 所示，此四種癌症細胞株皆有生長激素受體之表現，且相較於其他細胞之結果，又以人類子宮頸癌細胞 HeLa 中的生長激素受體表現量最高，人類肝癌細胞株 HepG2 次之。

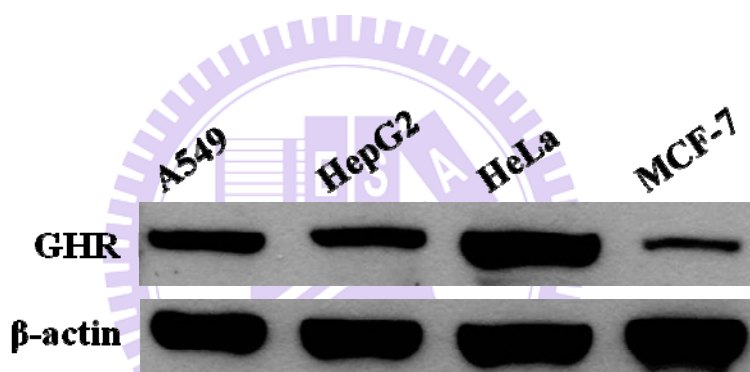


圖 28、不同癌症細胞株內之生長激素受體表現

A549 細胞以  $8 \times 10^5$  cells/well 種入 6-cm 細胞培養盤，置於  $37^\circ\text{C}$  細胞恆溫培養箱中培養 24 小時；第二天以 cell lysis buffer 裂解細胞並抽取細胞內總蛋白，定量後以西方墨點法分析生長激素受體之表現量。

## 壹、第六章 討論

### 壹-6-1 cND-GHRBP-GFP 複合體之定量與特性分析

在本實驗室先前的研究中指出，以基質輔助雷射脫附游離飛行質譜儀檢測 5 nm 羧酸化之奈米鑽石 (cND) 與生長激素受體結合蛋白 (GHRBP) 之接合比例，可估算出每一顆 5 nm 羧酸化奈米鑽石上接有兩個 GHRBP 分子，即 5 nm cND : GHRBP = 1 : 2。

在蛋白質的結構中，其 N 端為一個胺基，而 C 端為一羧基，而本實驗中選用 EDC 及 sulfo-NHS 之化學結合法作為接合 5 nm 奈米鑽石與蛋白質之策略，由於在此接合過程中，我們以生長激素受體接合蛋白與綠螢光蛋白率先結合在一起，該結果所得之蛋白質附合體所裸露於外端之 NH-端與單一蛋白分子所裸露之 NH-端理論上數目是一樣的，再使羧酸化奈米鑽石與此蛋白質複合體做二次接合，根據先前基質輔助雷射脫附游離飛行質譜儀檢測之結果，得到之 cND-GHRBP-GFP 複合體推估其奈米鑽石與蛋白質複合體之接合比例也為 1 : 2，而後我們選擇以紫外光吸收法來分析、定量其濃度。

一般正常的蛋白質中，因其結構中的芳香族胺基酸對於波長 280 nm 的激發光有吸收之特性，所以在以紫外光定量法中皆分析其於波長 280 nm 激發後之發射光強度；在本實驗所接合完成的 cND-GHRBP-GFP 複合體中，GFP 本身即為一個帶有螢光特性之特殊蛋白質，分離自水母體內之野生株 GFP 具有兩個激發波峰，其中位於 395 nm 者為主要的激發波峰，消光係數 (extinction coefficient) 為  $30,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ；而另一 475 nm 則為次要的激發波峰，消光係數為  $7,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 。在定量此一 cND-GHRBP-GFP 複合體時，我們避開使用波長 280 nm 之激發光作激發，係因為於此激發波長激發下所得之射波長訊號涵蓋了此複合體中的另一個蛋白質 GHRBP，如此，在定量中會因須要參考的變因太多，可能導致定量效果較不穩定與準確，故選擇以波長 395 nm 作為激發，在大約 510 nm 處會有一個 GFP 蛋白之主要訊號，依此訊號之強度輔以 GFP 於該發波長所對應之消光係數，可以進一步以 GFP 蛋白質的量作為訂定 cND-GHRBP-GFP 複合體的相對濃度。

在以原子力顯微鏡分析此奈米標靶分子時，可以看見其粒子外觀多為球狀，高度約 5-15 nm，但寬度則約 200-300 nm，此可能與探針的選擇有關。如圖 29 所示，原子力顯微鏡的量測會因探針形狀與直徑等因素，造成量測結果的誤差，圖中探針形狀無法完全與待測樣品形態相吻合，故會有高低落差，使得寬度與實際值有差異。而在動態光散射儀的分析中，其粒徑大小約 9 nm，因此粒子之尺度極為微小，因此優點是無論是在細胞作吞噬或是於生物體內作攜帶皆較具有優勢。又因為於顯微鏡影像中觀察到，此 cND-GHRBP-GFP 容易聚集成一群一群的小叢集，故在使用固定波長之雷射激發後，可能會因此而放大奈米鑽石結構改變之效應，對於其在研究策略中的角色有更為加成之作用。



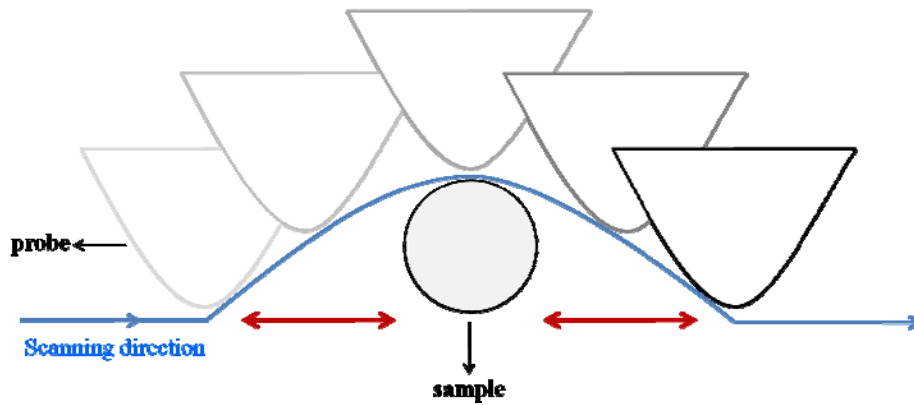


圖 29、原子力顯微鏡掃描示意圖

錐狀為原子力顯微鏡掃描時所使用之探針；圓形為欲偵測樣品；藍色實線為探針掃描路徑；紅色實線為探針掃描誤差區域

本實驗主要使用之奈米標靶分子 (cND-GHRBP-GFP) 中，主要是由奈米鑽石、生長激素受體結合蛋白、綠螢光蛋白三者所接合而成。在先前即提到因奈米鑽石具有高度之生物相容性以及低生物毒性，加以其經由雷射激發後，熱聲子效應帶來結構上  $sp^3$  到  $sp^2$  之改變，此奈米鑽石爆炸現象對於細胞來說可能為具有一定規模之細胞壓力或傷害，使其成為本研究中的一新穎賣點；在生長激素受體結合蛋白的來源為分離自魚類，雖然其功能上與人類生長激素相同具有可以與生長激素受體辨識結合之特點，但也因此魚種與人類親緣性較遠，故不會對人類細胞之增生有調控的效果，再者生長激素受體又為本實驗所選用模式癌症細胞中的大量表達特殊蛋白，相當具有標靶分子之特性，因此在此選用魚類生長激素受體結合蛋白為一理想的專一性辨識分子；而綠螢光蛋白因其本身之螢光特性，加以其已於諸多研究甚至活體上皆廣泛作應用，為一個良好的標定蛋白，在此處使用綠螢光蛋白更便利於我們追蹤 cND-GHRBP-GFP 複合體之位置。

#### 壹-2 多光子效應對奈米鑽石與細胞之影響

在奈米鑽石中，其能隙為：

$$E_g(n) = 3.554 + 8.094 \times n^{-1/3} \quad [193] \dots \dots \dots (\text{Eq. 2})$$

其中  $n$  為奈米鑽石叢集大小 (cluster size)， $E_g(n)$  為奈米鑽石在此大小下的能隙大小，在 5 nm 大小的奈米鑽石，其能隙大約為 5.47 eV [178]，利用公式 2 可推得，其吸收波長約為 226.7 nm。

$$E(\text{eV}) = 1240 \text{ eV/nm} \dots \dots \dots (\text{Eq. 3})$$

換句話說，如果我們需要讓 5 nm 的鑽石吸收雷射的能量，理想值為使用接近 226.7 nm 波長的雷射。我們於實驗中使用的 Nd:YAG 雷射，於未使用倍頻器 (frequency doubler) 時，會產生 1064 nm 的遠紅外線，而使用倍頻器後，可調整為 532 nm、355 nm、266 nm 的不同波長雷射。雖然波長 266 nm 之雷射光最接近奈米鑽石可吸收的波長，但因 266



nm 為紫外線光源，對組織之穿透率較低，可能會影響後續之應用，並且紫外線光源容易被生物分子吸收，造成生物分子的傷害，且因為其波長與理想吸收波長 (226.7 nm) 雖然最接近，但仍無法完全誘導奈米鑽石爆炸；此外，355 nm 之雷射光亦有上述考量。故我們最終選用 532 nm 當作雷射光源，根據多光子效應，當同時 2~3 顆光子能量被吸收時，其能量會達到 4.66 eV ~ 6.99eV，而此範圍之能量可被奈米鑽石中的亞硝基 (nitroso) 吸收，並且因奈米鑽石本身具有結構缺陷，而造成奈米鑽石的結構與型態發生改變，體積會膨脹大約 10 倍左右[178]，由此可知，當使用奈秒雷射照射奈米鑽石時，即使亞硝基的吸收波長與 532 nm 雷射相差甚遠，但因為多光子效應，使得奈米鑽石中的亞硝基仍然有一定機率吸收雷射能量，進而改變奈米鑽石結構，造成被奈米鑽石標定的生物分子被破壞。

壹-6-3 cND-GHRBP-GFP 複合體經由雷射激發後，造成癌細胞損壞與死亡之可能路徑

在本實驗中選用兩種波長分別是 266 nm 與 532 nm 的高脈衝雷射作為激發，其中，波長 266 nm 已位於紫外線 C (ultraviolet C, UVC；波長範圍 200 nm-290 nm) 之波段。

在先前研究中指出，紫外光當中較長波長的紫外光 A (ultraviolet A, UVA；波長範圍 320 nm-400 nm) 與紫外光 B (ultraviolet B, UVB；波長範圍 290 nm-320 nm) 會誘導體內細胞之氧化壓力與蛋白質變性；而在 UVC 波段照射下將造成 DNA 損壞 (DNA damage)、細胞週期中止 (cell cycle arrest)、細胞凋亡等效應[194]。針對 DNA 損傷的部分，UVC 照射下主要將使 DNA 形成嘧啶二聚體 (pyrimidine dimers) 以及 6-4 光學產物 (photoproducts)[195, 196]，尤其一些誘導 DNA 損壞的訊息，包含檢查點激酶 ATR (ataxia telangiectasia and Rad3-related checkpoint kinase 1, ATR/Chk1)、jun 胺基端激酶以及 p38 蛋白激酶 (p38 kinase) 路徑皆是由 UVC 照射後所觸發的分子反應[194]。

在拉曼光譜分析 266 nm 之波長紫外光高脈衝雷射照射奈米鑽石，發現當功率高於 30 mJ 0.1s/step 時，奈米鑽石將會產生體積膨脹、爆炸之效應；但在此相同條件下(266 nm 波長激發)，受到照射的 A549 肺腺癌細胞在小於 5 mJ 0.1s/step 時，細胞型態已明顯與無照射組不同。而於免疫細胞化學染色中，我們分析了經由波長 266 nm 激發後的 A549 肺腺癌細胞發現，無論有無處理 cND-GHRBP-GFP 複合體之細胞內部皆表現出大量的細胞發炎因子 COX-2，對照先前研究中所得結果(UVC 波段可引致常細胞凋亡之現象)並不相符，其原因可能是因為本研究中所使用的波長 266 nm 雷射光為一高頻率、快速(奈秒層級)、連續性的雷射，其多光子的效應使所照射之能量提高為原來 UVC 的數倍之多，相對於細胞造成的傷害規模也提高許多，因此使細胞在強大的壓力下走向細胞壞死路徑。

相對於波長 266 nm 雷射，波長 532 nm 雷射的激發就不那麼劇烈。在拉曼光譜的分析中顯示，激發光 532 nm 之雷射以 30 mJ 10s/step 的條件對奈米鑽石作反應，則奈米鑽石結構已造成改變，此時 A549 肺腺癌細胞於相同條件下並不會有細胞損傷或死亡的現象。於此，加入了 cND-GHRBP-GFP 複合體於細胞中使其與細胞膜上的生長激素受體作接合，而後再以每一點相同功率與相同激發時間條件下來處理細胞，結果由錐蟲藍排除法染色之結果發現，加入 cND-GHRBP-GFP 複合體處理的 A549 肺腺癌細胞，其相較於不加入 cND-GHRBP-GFP 複合體之細胞有大量死亡的情形，此結果顯示，在加入了

cND-GHRBP-GFP 複合體於細胞中的實驗組中，我們所設計的具有靶向性的 cND-GHRBP-GFP 複合體除了能夠與細胞結合之外，還會因為奈米鑽石被激發後造成癌細胞的深害；並且加以了解免疫細胞化學染射之結果，我們得知在加入 cND-GHRBP-GFP 複合體處理後又利用 532 nm 雷射誘發之 A549 肺腺癌細胞，其細胞內所表現出的活化態細胞凋亡蛋白 caspase-3 相較於控制組明顯有大量被誘導表現的跡象，以及細胞凋亡相關因子 AIF 也由細胞質中粒線體內的位置轉移到細胞核內作用。針對此一結果，可以推測出經由波長 532 nm 雷射的激發下，cND-GHRBP-GFP 複合體將誘導 A549 肺腺癌細胞走向細胞凋亡之細胞死亡路徑。

細胞膜係由脂質、蛋白質與醣類所構成的雙層流體膜狀組織，通常在受到單點或小部分的損傷時，因其組成特性可促使細胞膜再融合為原先的完整構造，而因為一個肺腺癌細胞可能同時接合上多顆的 cND-GHRBP-GFP 複合體，經由雷射激發後會於細胞膜上造成多個孔洞，導致無法經由細胞自我修復而使細胞膜重新完整組合，此也為實驗設計之一要點。並且在日後的研究當中，即可針對細胞凋亡相關的其他蛋白質加以分析其活性與表現，使建立出本套系統所導致的分子機制。

#### 壹-6-4 接合癌症標靶因子之奈米鑽石日後可能之應用

針對不同的癌症當中，了解其腫瘤細胞表面之受體種類有助於標靶治療之研究與應用。通常在這些細胞表面受體的構型中係由細胞外區域 (extracellular domain)、穿膜區域 (transmembrane domain) 與細胞內區域 (intracellular domain) 三大部分所組成，其胞外區域具有一段配體結合位，而在胞內區域中則有一段參與訊息活化之酪胺酸激酶區段 (tyrosine kinase domain)，而此酪胺酸激酶區也最常被視為標靶治療之目標區域[197]。針對這些特定受體作專一性之治療目前常見之模式如下：(1) 利用此受體的配體相似物 (ligand analog) 與其配體競爭受體結合位，使原先參與活化訊息傳遞之配體因無法結合至對應受體而失去功能；(2) 針對受體尾端的酪胺酸激酶區域設計專一性結合之抗體，使受體無法進行自我磷酸化而阻斷訊息傳遞[198]；(3) 利用反寡義核甘酸直接抑制受體與配體之基因轉錄，而進一步抑制受體與配體之蛋白質表現。而於此研究中，所利用之概念即是以癌細胞表面受體之配體相似物與其本身之配體作競爭。

奈米鑽石經由化學修飾後其表面帶有羧酸基可視為攜帶癌細胞受體結合蛋白之工具，第一步即針對受體結合位置具有競爭的功能，並且於日後研究中可搜尋不同癌症細胞中特殊表現之受體，針對其配體作相對之設計，使其在不影響正常細胞功能情況下，能在接合上奈米鑽石後將整個附合體帶入細胞並專一性的辨識至癌細胞表面；並且可尋找不同物種之間相對於某癌細胞表面受體之配體蛋白，利用基因比對出與人類細胞產生低活性之異種配體蛋白，即可作為一理想之配體類似物。

並且，利用穿透性高之紅外光波長 1064 nm 作為基礎，可穿透較深層之組織，同時經由多光子效應使 1064 nm 轉換成為 532 nm 之高能雷射，經由 532 nm 雷射激發能進一步誘發於細胞中之 cND-GHRBP-GFP 複合體，產生可使癌細胞凋亡之連續效應。目前設定為研究模式探討之奈米鑽石經由高密度脈衝雷射激發後產生的化學性結構變化，及此變化於癌症細胞表面誘導之反應機制於日後醫學治療上之應用無可限量。

貳、 anti-CEACAM6 與 anti-HER-2 單一抗原結合功能區抗體  
於乳癌標靶治療之研究



## 貳、第一章 研究背景

### 貳-1-1 乳癌背景

乳癌為目前西方國家女性中被診斷出發生頻率最高之癌症[199]，而美國國家衛生統計中心 (National Center for Health Statistics, NCHS) 在 2010 年所做的統計數據顯示，女性中乳癌的終生發病率達 10~13%[200]。

而在台灣區，乳癌目前僅次於子宮頸癌位居女性癌症發生率第二位，每年新增之乳癌病患就超過 5000 人，而女性平均一生中有 9% 的機率罹患乳癌。

### 貳-1-2 乳癌之進程

癌症的發生首要伴隨的是細胞的不正常轉型 (transformation)，同時這些細胞可能失去調控細胞凋亡 (apoptosis) 之能力，進而轉變為癌化細胞並開始不正常之增生。

於乳癌中，其伴隨巨噬細胞浸潤作用使其固態腫瘤中佔有 50-80 % 之免疫球細胞。且之後伴隨腫瘤細胞之侵犯與轉移，以及周邊上皮細胞受刺激後造成血管新生並供給腫瘤細胞營養，使腫瘤漸漸變大等，為乳癌主要之進程(見圖 30)；並且腫瘤的侵犯 (invasion) 與轉移 (metastasis) 是癌症病人發病與死亡之主要原因[201]。下列針對乳癌進程個步驟作簡單介紹。

#### 貳-1-2-1 細胞不正常增生

乳癌的發生原因到目前為止尚未有定論，依據流行病學以及臨床統計調查，乳癌的發生可能與基因遺傳[202, 203]、內分泌[204]、飲食[205, 206]、病毒感染[207, 208]等因素有關，當乳癌開始時，與一般的癌症相似，細胞會不受控制的增生[209]，其作用機制可能是經由活化 Her1/Erk1/2[210]、PI3K/Rac/PAK[211]等路徑造成細胞增生。

#### 貳-1-2-2 巨噬細胞浸潤癌症細胞

腫瘤組織中，包含腫瘤細胞 (tumor cells) 與基質細胞 (stroma cells) 兩部分，並且周圍被細胞外基質 (extracellular matrix) 所環繞，並且於更早的研究中顯示了，這些腫瘤細胞與基質細胞為腫瘤的進程提供了一個特殊且必須的微環境[212, 213]。巨噬細胞對於腫瘤生長與發展之影響範疇極廣與複雜，雖然被活化的巨噬細胞可能具有抗腫瘤活性，但相對也證實腫瘤細胞能夠逃過巨噬細胞對抗腫瘤活性 (tumoricidal activity) 的能力[214]。

在 1970 年代後期的研究中證實，腫瘤中有一群主要的白細胞族群，也就是之後所稱的腫瘤相關巨噬細胞 (tumor-associated macrophages, TAM)[215]。腫瘤相關巨噬細胞通常會被吸引至腫瘤周邊位於腫瘤與基質之交界，並且其為形成腫瘤基質最主要的組成成份，在一些研究中並明確指出腫瘤相關巨噬細胞的浸潤作用與乳癌病人的血管新生與不良預後有高度關聯性[216, 217]；而在 2006 年由 Condeelis 與 Pollard 的動物實驗中，利用基因突變剔除大鼠體內之巨噬細胞將會抑制腫瘤的進程以及轉移[218]。一般，腫瘤相關巨噬細胞是被循環的單核球細胞帶到組織中，而後因其所含之趨化因子(包含單核球趨化蛋白 1 (monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1/CCL2))[219, 220]、巨噬細胞發炎



蛋白 1 $\alpha$  (macrophage inflammatory protein 1 $\alpha$ , MIP-1 $\alpha$ /CCL3))與生長因子(例如正常 T 細胞表現與分泌之 RANTES (regulated upon activation, normal T-cell expressed, and secreted)/CCL5、群落刺激因子接受器 1 (colony-stimulating factor 1, CSF-1)[221]、腫瘤壞死因子  $\alpha$  [222]、血小板衍生生長因子(platelet-derived growth factor, PDGF)[223])會進一步的趨化、影響腫瘤細胞製造出一個利於腫瘤生長與發展的環境[224]。

### 貳-1-2-3 癌細胞侵犯組織

癌症為組織特異性疾病，不同組織的癌症會有不同的侵犯與轉移機制。而乳癌與侵犯過程相關的生物標記 (biomarker)尚未完全清楚。至目前的研究，乳癌侵犯的分子機制似乎與小鳥苷三磷酸酶 (small GTPases)中的二磷酸腺苷核糖基化因子 (ADP-ribosylation factor, Arf)有關[225]。二磷酸腺苷核糖基化因子在真核生物的演化中有高度保留性，其功能與細胞膜運輸與重塑有關[226]，在哺乳動物中，二磷酸腺苷核糖基化因子可分為六個亞型 (isoform)蛋白[225]，在其中，可以依結構相似度分類為三類，二磷酸腺苷核糖基化因子 1~3 (Arf 1~3)為第一類，二磷酸腺苷核糖基化因子 4~5 (Arf 4~5)為第二類，二磷酸腺苷核糖基化因子 6 (Arf 6)為第三類。二磷酸腺苷核糖基化因子 6 在眾多二磷酸腺苷核糖基化因子中，物種歧異度最大，其主要功能是調節內噬作用 (endocytosis)，及細胞膜上受器的表現與回收[227-229]。相較之下，二磷酸腺苷核糖基化因子 6 在乳癌中的表現量較高，在有侵犯的乳癌中，二磷酸腺苷核糖基化因子 6 的表現量甚至可以達到原本的 10~20 倍[230]。

表皮生長因子受器 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 於多種癌症細胞中大量表現[231, 232]，在一些乳癌細胞中，表皮生長因子 (Epidermal growth factor, EGF)的刺激與癌細胞的侵犯有關。當表皮生長因子與表皮生長因子受器結合，會磷酸化表皮生長因子受器上與肉瘤同源蛋白 2 (srcoma homology 2, src homology 2, SH2)相關的 Tyr1068 或 Tyr1086 位置[233-235]，在活化受器後，鳥嘌呤核糖酸交換因子 100 (guanine nucleotide-exchange factor 100, GEF 100)會直接與活化後的表皮生長因子受器結合，並活化二磷酸腺苷核糖基化因子 6。活化後的二磷酸腺苷核糖基化因子 6 會與 AMAP1 (ArfGAP with SH3 domain, ankyrin repeat and PH domain 1, ADP-ribosylation factor-directed GTPase-activating protein)、樁蛋白 (paxillin)、皮層肌動蛋白 (cortactin)、神經元突觸前膜蛋白 II (amphiphysin II, Amp II)形成複合體，並造成細胞膜的突起，最後，此複合體會分解細胞外基質，使乳癌細胞可以進行侵犯過程[225, 236]。

### 貳-1-2-4 血管新生

不論是原位癌或是轉移後的癌症，血管新生 (angiogenesis)在乳癌均扮演著重要的角色[237, 238]，提供新生癌細胞的營養提供及廢物代謝的途徑。基質金屬蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMP)會降解 (degradation)基底膜 (basement membrane)與細胞外基質 (extracellular matrix)[239, 240]，提供癌細胞血管新生的能力。一般而言，體內的組織金屬蛋白酶抑制因子 (tissue inhibitors of metalloproteinases, TIMPs)會與基質金屬蛋白酶達成平衡以避免血管新生[241, 242]，當血管新生時，會增加基質金屬蛋白酶的表現量，



打破其平衡，並促進腫瘤生長、侵犯、轉移[243, 244]。

### 貳-1-2-5 癌細胞轉移

癌細胞轉移的過程分成下列幾個步驟：包括細胞外基質被侵犯、細胞向外滲透至血管中、運輸至整個血液循環系統、貼附到其他組織的內皮細胞上、透過血管壁外滲、針對器官特異表現因子做遷移並且大量增生新細胞[245]。

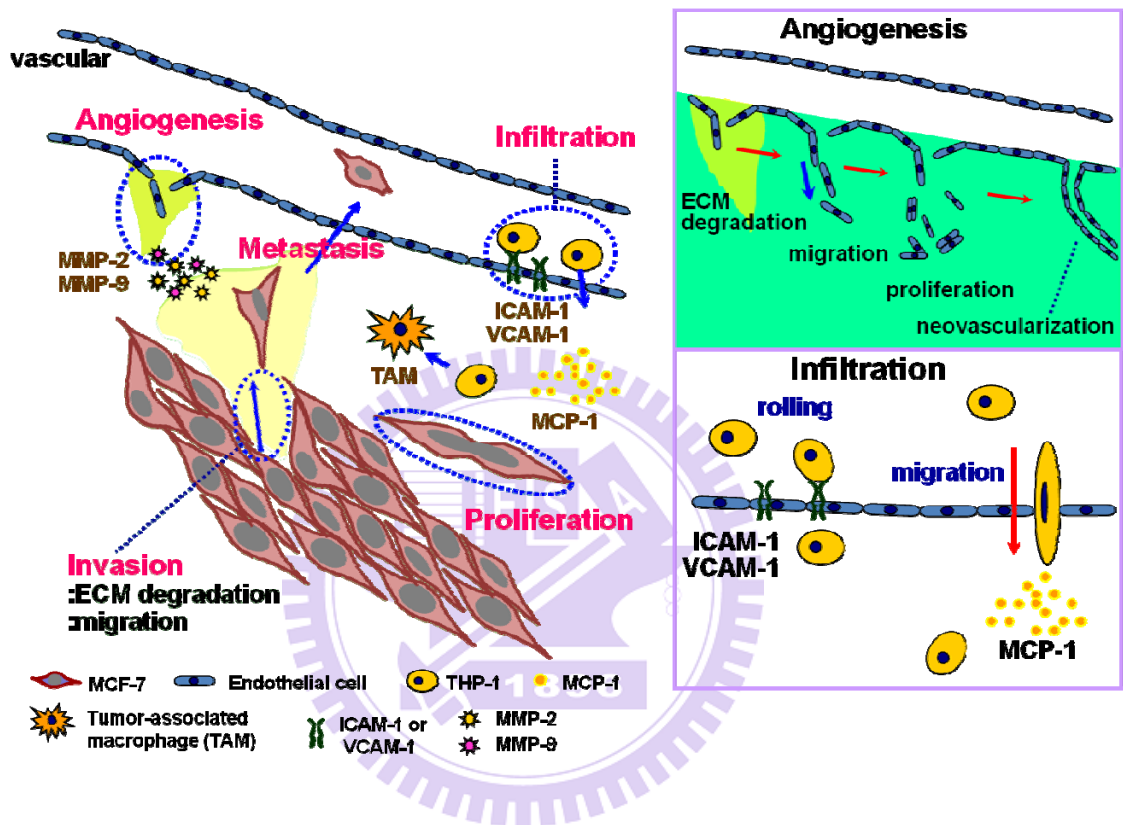


圖 30、癌症進程示意圖

### 貳-1-3 目前乳癌之治療

目前對於乳癌之治療主要有四大方式：(1)利用手術療法直接切除患部以及大部分的周邊液下淋巴結，以確保其轉移或擴散；(2)以放射線療法之高能量射線殺死癌細胞，達到縮小腫瘤的目的；(3)利用化學藥物殺死或抑制癌細胞，甚至控制已轉移的微小癌細胞群之化學療法；(4)直接以荷爾蒙療法於不同期乳癌細胞所表現之特殊荷爾蒙受體專一性抑制，阻斷細胞的生長，並且針對賀爾蒙受體為陽性反應者，可以經由藥物或抗體達到改變賀爾蒙的目標。

乳癌與一般癌細胞不同點在於其會受到荷爾蒙之刺激而加速生長，而一些乳癌細胞表面有動情激素受體 (estrogen receptor, ER)及黃體激素受體 (progesterone receptor, PR) 的表現，荷爾蒙治療的方式針對這些受體的正向表現會有愈好的治療效果。而近二十幾年發現另一個影響乳癌治療結果的危險因子，即人類表皮生長因子受體 2 (human epidermal growth factor receptor 2, HER-2)，此受體過度表達將加速乳癌細胞之分裂、增

生，以及增加癌細胞轉移、造成癌細胞對藥物之抗藥性，導致治療失敗。因此，目前乳癌對於人類表皮生長因子受體 (HER-2)之檢測，常作為治療及預後的參考。

#### 貳-1-4 人類上皮生長因子受體 2

人類上皮生長因子受體 2 (HER-2; 或稱作 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2, ErbB2) 為上皮生長受體家族中的一員[246]，為細胞膜上的一種生長素受體，是一種跨膜蛋白 (transmembrane protein)[247]，並且其結構具有酪胺酸酶 (tyrosine kinase) 之活性[248]。HER 為媒介細胞增生與分裂所必須之受體，對於胚胎的分化與成熟組織的發展有著重要的影響[249]。當 HER-2 基因異常擴大表現使得轉譯出之 HER-2 蛋白質過量表現，則會增強癌細胞之繁殖[250]以及抗凋亡[251]能力，且 HER-2 過度表現之情形已成為諸多癌症所表現出的分子特徵，例如乳癌、卵巢癌、胃癌以及大腸癌[252, 253]。而目前文獻也指出其在腫瘤發生 (tumorigenesis) 扮演了相當重要的角色[254, 255]，為一個原致癌基因 (proto-oncogen) [256-258]。

在乳癌患者中，HER-2 過度表現為一項獨立能夠預測患者存活率之分子，目前在原發性乳癌病患中，以發現有 25%~30%之癌細胞中有 HER-2 過度表現的狀況，並且 HER-2 過度表現之乳癌患者其病程惡化與死亡機率皆較非 HER-2 過度表現之患者為高，其還將造成患者治療之預後不良 (poor prognosis)、疾病再惡化、抗化療 (resistance to chemotherapy) 以及抗荷爾蒙治療 (resistance to hormone therapy) 等情形[247, 259, 260]，而縱使透過手術治療，癌細胞仍然具有較高的復發及轉移之機率。HER-2 在上皮組織的癌變以及其在惡性腫瘤的選擇性大量表達皆使其成為一個重要並關鍵性的標的，如此便成為一理想的免疫治療 (immunotherapy) 之標靶[261]。

現今有越來越多的研究發表針對 HER-2 基因治療所用之單株抗體 (monoclonal antibody)，可直接作用於 HER-2，將誘發腫瘤細胞內之 HER-2 表現行之改變，包括：降低 HER-2 於癌細胞內之調控能力、抑制腫瘤細胞之生長、降低血管內皮生長因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF)之產生、回復細胞因子之抗性 (cytokine resistance) 以及 E-鈣黏蛋白 (E-cadherin) 之表現量[262]。在 2005 年美國癌症醫學會發表之標靶藥物賀癌平 (Herceptin) 其本身為一種人類化抗 HER-2 單株抗體 (humanized anti-HER-2/neu antibody, Herceptin; Genentech, Inc., South San Francisco, CA, USA; 商品名為 Trastuzumab)，目前於臨床試驗被證實針對 HER-2 相關之轉移性乳癌病患為有效用藥[263]，亦即賀癌平對於 HER-2 呈陽性反應之乳癌病患，不論是單獨用藥或是合併化學治療藥物，對於轉移性乳癌確實有不錯的療效[264-266]。而其分子作用機制雖未完全被了解，但已證明其具有破壞 HER-2 系統相關的生長訊息傳遞路徑之功用[262]。現今用於乳癌術後之輔助性治療，使癌症復發機率降低一半，並且死亡率有降低三分之一 [267, 268]。

#### 貳-1-5 癌胚抗原相關黏著分子 6

癌胚抗原 (carcinoembryonic antigen, CEA)為一種血漿糖蛋白[269]，在 1965 年首先由 Phil Gold 與 Samuel O. Freedman 所定義，並於人類大腸癌組織中萃取出[270]。癌胚

抗原存在於胚胎當中，出生後無法被偵測出，但若發生惡性腫瘤時，癌胚抗原則會形成，且其成為某些癌症診斷的重要標的蛋白之一[271, 272]，例如：大腸癌 (colorectal carcinoma)[273, 274]、肺癌 (lung carcinoma)[275]、胃癌 (gastric carcinoma)[276]、胰臟癌 (pancreatic carcinoma)[277]、乳腺癌 (breast carcinoma)[274]等等。在其他研究中已知，其與惡性腫瘤有極大的相關性，尤其針對腫瘤的轉移具有誘導的作用[245, 278]。

癌胚抗原相關黏著分子 6 (carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6, CEACAM6)，也稱做 CD66c (cluster of differentiation 66c)[272]，為癌胚抗原家族中的一員，其二者皆包含在免疫球蛋白超級家族 (immunoglobulin superfamily) 中，在體內由顆粒細胞 (granulocytes) 和其祖先細胞 (progenitors) 所釋放。癌胚抗原相關黏著分子 6 為一種糖基化磷脂酰肌醇錨定蛋白 (glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchored protein)，這種細胞表面蛋白與 S-蛋白所媒介的融合活性具有直接相關性，並且其也是一個腫瘤相關抗原。並且癌胚抗原相關黏著分子 6 會表現在正常的人類上皮細胞以及骨髓細胞，然而，其也高度表現於很多惡性腫瘤細胞中，例如：胰臟癌細胞、肺癌細胞、大腸癌細胞以及乳癌細胞等。

#### 貳-1-6 簡介單一抗原結合功能區抗體 (single-domain antibody, sdAb)

生物體內所存在的抗體，結構通常都以含有兩條重鏈 (heavy chain) 與兩條輕鏈 (light chain) 所組成，而單一抗原結合功能區抗體於自然界中只存在於兩個物種，一為水生哺乳類動物-鯊魚 (shark)，而另一則為駱駝科 (Camelidae) 之陸生哺乳類動物，此二物種體內之抗體為自然缺失輕鏈之形態。

單一抗原結合功能區抗體的歷史源於 1993 年，由 Hamers-Casterman 等人於駱駝科動物(包括：camels, dromedaries, llamas) 發現，牠們的血清中含有少量輕鏈缺失之抗體 [279]。此抗體稱作重鏈抗體 (heavy-chain antibody, HCAb)，相較於正常抗體，因為少了第一段固定區(constant domain 1, CH1)，故其分子量較小。在輕鏈缺乏的狀況下，重鏈抗體結合至其抗原係以一個單區域的形式，此區域為重鏈免疫球蛋白之變異區 (variable domain of heavy chain)，被稱作 VHH，有別於免疫球蛋白之變異區 (variable domain, VH)[280]。因此，來自有功能的免疫球蛋白之 single-domain VHH 為最小的具有完整結合於抗原之能力之抗體。

IgG 抗體於 dromedary 與 llama 血清中所含之濃度大約為 5-10 mg/ml。在 dromedary 體內，自然血清中 IgG 約有一半的數目為重鏈抗體[279]，而在 llama 內則比例較少，大約是 25 %-45 %[281]，其餘的部分則是體內正常構型之含有二重鏈、二輕鏈所組成之抗體。而於 2000 年，Nguyen, Vu 與 Harmsen 等人首次由 cDNA 中建構 (clon) 取得[282]。

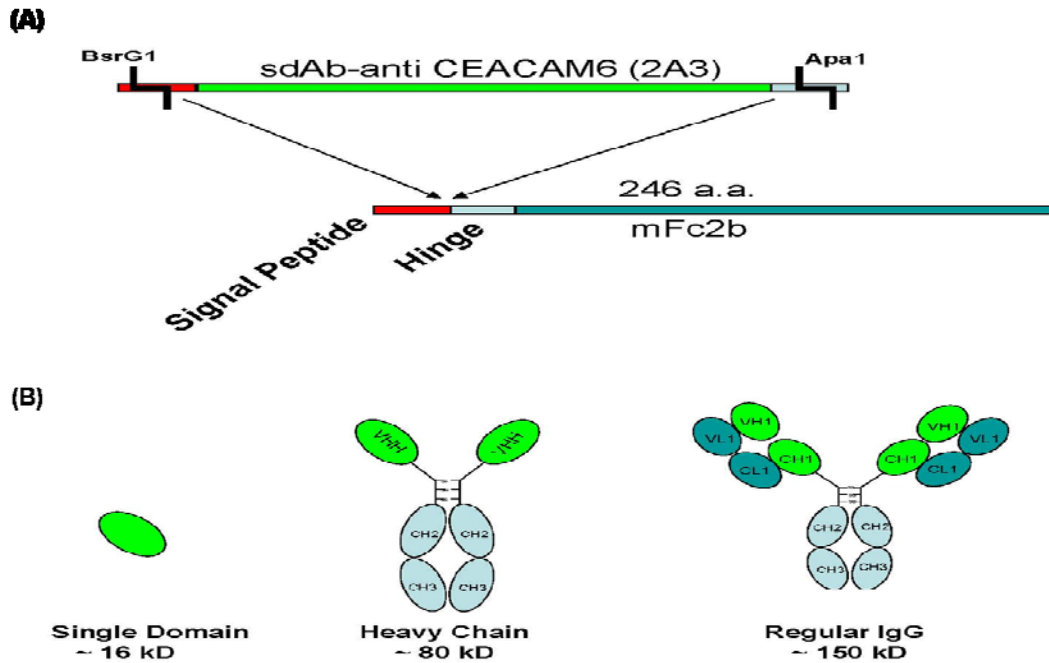


圖 31、sdAb 與 HCAb 抗體之構築與結構示意圖

(A)與(B)分別為單一抗原結合區抗體 (sdAb) 2A3 以及重鏈抗體 (HCAb)之一級結構與卡通概略圖。單一抗原結合區抗體位於駱駝科動物(例如：駱馬 (Liama))體內之重鏈抗體結構中的可變區域 (variable regions)，其可構築並表現於細菌系統中。Regular IgG 為全長 IgG 抗體；Heavy chain 為重鏈抗體；Single domain 為單一抗原結合功能區抗體。

#### 貳-1-7 單一抗原結合功能區抗體應用於 CEACAM6 表現相關之癌症治療現況

由先前研究指出，癌胚抗原相關黏著分子 6 過度表現於胰臟癌中，且相較於正常胰臟細胞，其表現於惡性之胰臟細胞更是高出 20 至 25 倍之多。此癌胚抗原相關黏著分子 6 在胰臟癌細胞中的表達關係到癌細胞的黏附 (adhesion)、遷移、侵襲、轉移、血管新生以及藥物抗性(drug resistance)。經由單一抗原結合功能區抗體處理胰臟癌細胞株 BxPC3，可降低細胞增生之能力，且相較於現有之胰臟癌化療藥物 gemcitabin，只有單一抗原結合功能區抗體-2A3 會抑制腫瘤細胞的侵犯作用與血管新生。並且能夠針對減低基質金屬蛋白酶 9 之活性，進一步阻止腫瘤體生長以及轉移。



## 貳、第二章 研究動機與策略

### 貳-2-2 研究動機

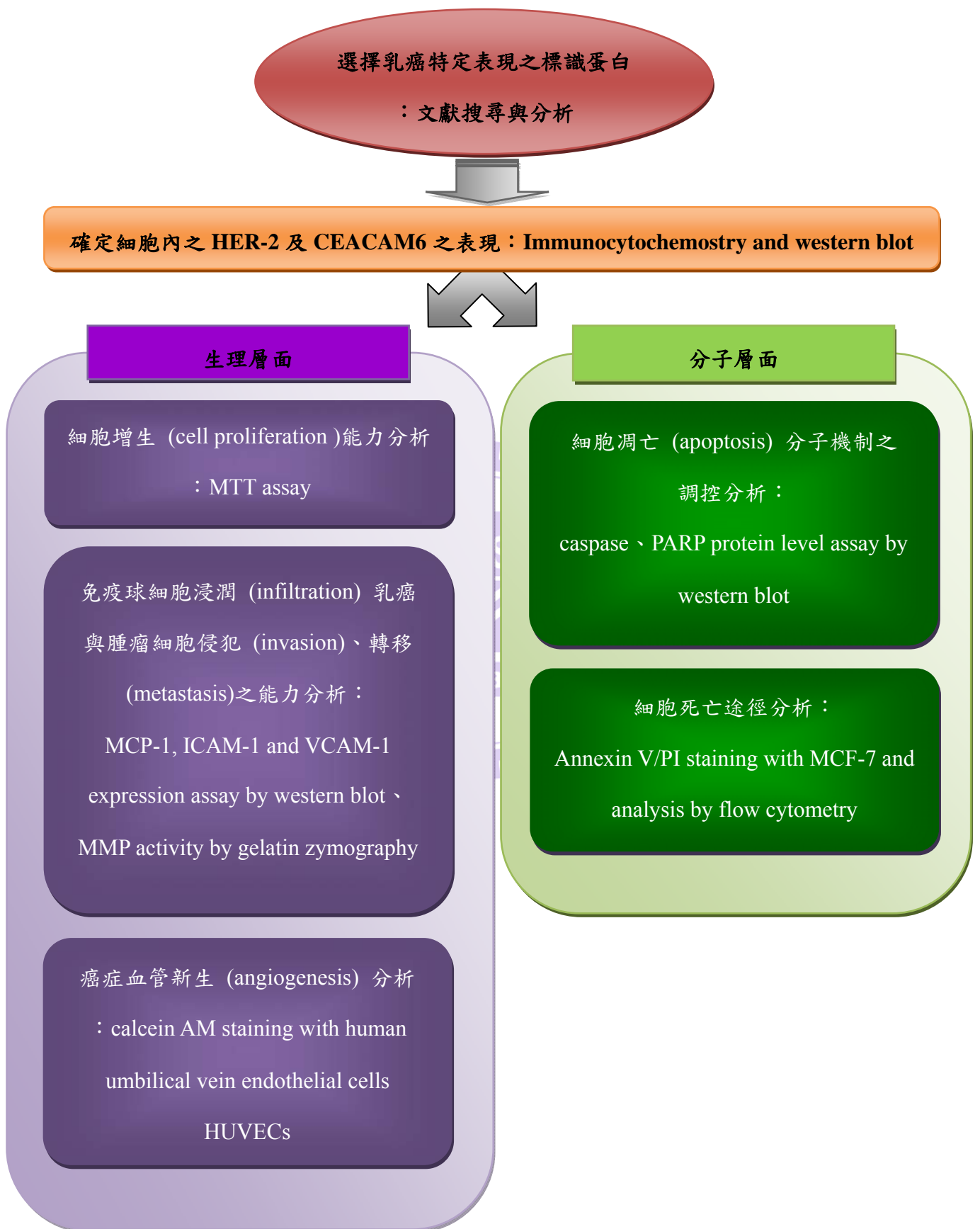
於乳癌中，HER-2 基因之過度表現之情況於現有診斷中已經作為一獨立判斷病患預後以及存活率的指標，而這種病患往往佔了乳癌病患總數將近三分之一，為不同型態分子調控之乳癌中的大宗，且目前也發現其對於一些藥物具有抗性，更增加了治療之困難度；而癌胚抗原相關黏著分子 6 不但表現於眾多惡性腫瘤中，乳癌細胞即為其中一種高度表現的腫瘤細胞，並且其為參與癌症進程與調控的重要角色。針對乳癌，此二者為極理想的標靶蛋白，而在實驗設計中又以此二者為主，設計了可以與其特殊辨識之單一抗原結合功能區抗體，利用這些抗體可以與乳癌細胞中的 CEACAM6 或 HER-2 以抗原抗體之方式所結合，而其結合後在乳癌細胞中所引發的連續反應正為我們好奇的部分。

根據單一抗原結合功能區抗體對於乳癌細胞中 CEACAM6 與 HER-2 專一性結合之特性，我們想知道在乳癌細胞株 MCF-7 中，經處理 2A3、2A3-Fc、HER-2、HER-2-Fc 以及處理以 2A3 與 HER-2，將對癌細胞進程中的每一個環節有何調控情況，並且與現有之乳癌化療藥物 docetaxel 療效作比對，這些抗體是否再效果更為靈敏。





貳-2-2 研究策略



## 貳、第三章 實驗原理

### 貳-3-1 蛋白質的表現與純化

將所需之單一抗原結合功能區抗體 (sdAb) 基因片段與 pSJF2 載體做接合，而後送入大腸桿菌 TG1 中，待細菌生長至對數期 (log phase) 時加入 IPTG 誘導蛋白質大量表現。載體 pSJF2 以載體 pUC8[283] 為設計基礎，其上帶有多個選殖位置 (cloning site)，其 N-端 (N-terminus) 為 OmpA 前導序列 (leader sequence)，而 C-端 (C-terminus) 則為 c-myc 抗原決定位標籤 (epitope tag)；且 pSJF2 上含有組氨酸 (histidine) 之序列，一串五個組氨酸所組成的組氨酸標籤 (histidine tag, His-Tag) [284] 具有金屬親和特性，將含有組氨酸標籤之蛋白質通過含鎳離子 ( $\text{Ni}^{2+}$ ) 的親和性層析管柱，此時組氨酸會與鎳離子螯合而結合在管柱上，而菌液中其它不含組氨酸標籤的蛋白質會質皆流出管柱中，達到純化的效果[285]。而實驗選用 TG1 品系之大腸桿菌，其含有表現載體 (expression vector)，可選擇性轉錄 pSJF2 上面所接之欲表現基因，並大量表現(如圖 32)。

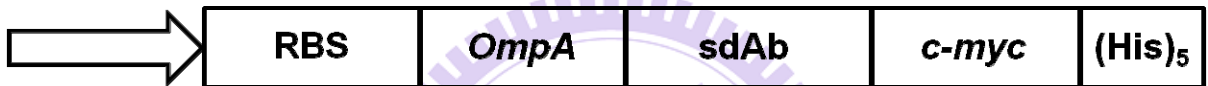


圖 32、構築單一抗原結合功能區抗體之 DNA 片段於 pSJF2 載體中之策略簡圖

圖中，箭號為起始方向；RBS 表示核糖體結合位；OmpA 為前導序列；sdAb 表示單一抗原結合功能區抗體之基因序列；c-myc 表其基因片段；His 表組胺酸。

而重鏈抗體之基因片段則選殖送入哺乳類表現系統 pTT5 載體中，而後轉殖於大腸桿菌 TG1 中，待細菌生長至對數期 (log phase) 時加入 IPTG 誘導蛋白質大量表現。載體 pTT5 衍生自 pTT，具有一個 EB 病毒的複製起始點 (origin of replication, OriP)。其載體內包含了巨細胞病毒啟動子 (cytomegalovirus promoter, pCMV)、腺病毒三聯前導序列 (adenovirus tripartite leader, TPL)、腺病毒主要晚期啟動子之增強子 (adenovirus major late promoter enhancer, Enh MLP) 所合成之內含子 (intron)，並終止於兔子之 beta-球蛋白 (beta-globin) 之多聚腺苷酸化訊號 (polyadenylation (PA) signal)。而後將構築完成之 pTT5-HCAb 產物利用聚乙烯亞胺 (polyethylenimine, PEI) 攜帶、轉染進入小鼠腎表皮細胞株 293-6E 中。聚乙烯亞胺為一帶正電之聚分子，其會包覆 DNA 而形成一複合物，而後被細胞噬入，則欲表達之基因為此可在細胞中表現。細胞培養五天後收取細胞培養液，並藉 G 蛋白親和層析管柱 (protein-G affinity chromatography) 純化之。親和性層析純化之原理係藉著層析管柱中之配體 (ligand) 會專一性辨識待純化物中的特殊分子或蛋白，而本實驗係藉由 protein-G 與 IgG 之專一性結合進一步純化出重鏈抗體。

### 貳-3-2 明膠蛋白酵素電泳法 (Gelatin zymography)

在一些細胞中會分泌基質金屬蛋白酶，因此在細胞培養液中便含有基質金屬蛋白酶。於過去研究指出，眾多基質金屬蛋白酶有一些 (MMP-1、MMP-2、MMP-3、MMP-7、MMP-9) 具有能夠分解明膠 (gelatin) 之特性，其中又以 MMP-2 以及 MMP-9 兩者分解明

膠之能力最強，一般稱作明膠酵素 (gelatinase)。利用此一性質，在置備蛋白質膠的過程中加入明膠於膠體內，以細胞培養液進行蛋白質膠體電泳後，以 2.5% (v/v) Triton X-100 移除膠體中之 SDS，並以含有 0.02% Bij35 非離子型介面活性劑，使明膠酵素分解掉膠體中含有 MMP-2 與 MMP-9 處之明膠。此時以考馬氏亮藍 (commassie blue) 將蛋白質膠體進行染色，則在膠體中具有明膠酵素活性之區域則無法被染成藍色，由退染溶液退染約半小時後即可清楚看到透明處為明膠酵素活性區。

#### 貳-3-3 十二烷基硫酸鈉聚丙稀醯胺凝膠電泳 (SDS-PAGE)

見第壹部分第三章。

#### 貳-3-4 西方墨點法 (Western blot)

詳述於第壹部分第三章。

#### 貳-3-5 錐蟲藍排除法 (Trypan blue exclusion)

詳述於第壹部分第三章。

#### 貳-3-6 MTT

詳述於第壹部分第三章。

#### 貳-3-7 Calcein AM 染色法

鈣黃綠素 (calcein) 原先為一較親水之結構，並不易進入細胞中，而後經由化學修飾，加上親脂性的乙羥甲基酯 (acetoxymethyl ester)，使其轉為脂溶性物質，易於穿透細胞膜雙層磷脂質結構。當活細胞處理了 calcein AM，細胞中內生性之脂水解酶會將疏水性的 calcein AM 水解成親水性的 calcein，此時，細胞將呈現 calcein 所帶的綠色螢光；又由於死細胞之細胞膜成線破裂狀態，則會將 calcein 釋放出細胞而不呈色[286]。而 calcein 對光的耐受性較高，能夠保留於活細胞之細胞質當中，屆時再以 495 nm 激發光激發，則其可發散 520 nm 之螢光(圖 33)。此法常用做活細胞之染劑，可測定細胞活性並觀察活細胞與死細胞之狀態、比例。

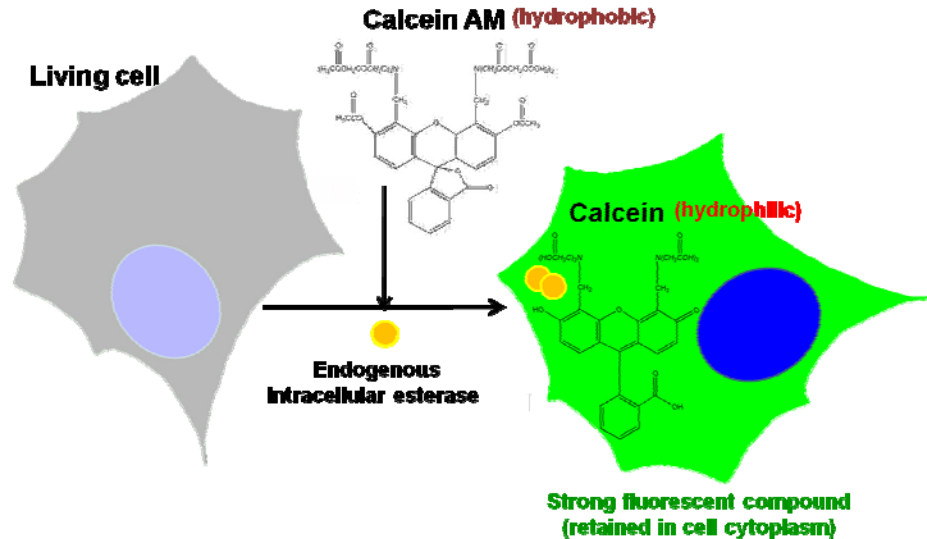


圖 33、 Calcein AM 細胞染色法示意圖

### 貳-3-8 免疫細胞化學染色 (Immunocytochemistry)

詳述於第壹部分第三章。

### 貳-3-9 螢光顯微鏡 (Fluorescence microscopy)

詳述於第壹部分第三章。

### 貳-3-10 Annexin V/PI assay

磷脂醯絲胺酸 (phosphatidylserine, PS) 為磷脂質蛋白成員之一，在正常的細胞中，其通常由翻轉酶 (flippase) 將之固定分佈於細胞膜磷脂質內側 (inner leaflet)。當細胞接收到細胞凋亡蛋白酶的訊息後，翻轉酶會協助催化磷脂醯絲胺酸翻轉、運動至細胞膜外側 (outer leaflet)[287]。

Annexin V 分子量大約為 35 kDa，為一個鈣離子依賴性 ( $\text{Ca}^{2+}$  dependent) 之磷脂結合蛋白，對於磷脂醯絲胺酸具有高度親和力的特性，使其高度結合上暴露於細胞膜外側的磷脂醯絲胺酸，再加上所使用之 Annexin V 已先與螢光分子-FITC 接合成為 Annexin V-FITC，做為一螢光偵測源，可檢測細胞凋亡早期之細胞[288]；而碘化丙啶 (propidium Iodide, PI) 為一種分子量為 668.4 Da 之螢光分子，以波長 488 nm 光激發可以在 562 nm 至 588 nm 測得螢光訊號，並且碘化丙啶也是一常用核酸染劑，可鑲嵌入細胞核中的雙股去氧核糖核酸 (DNA) 或核糖核酸 (RNA) 的鹼基上，通常其無法通過完整的細胞膜，故在細胞凋亡晚期或死細胞的細胞膜破損下，碘化丙啶方可透過細胞膜，且經由細胞質到達細胞核中將細胞核染紅而做檢測[288, 289]。

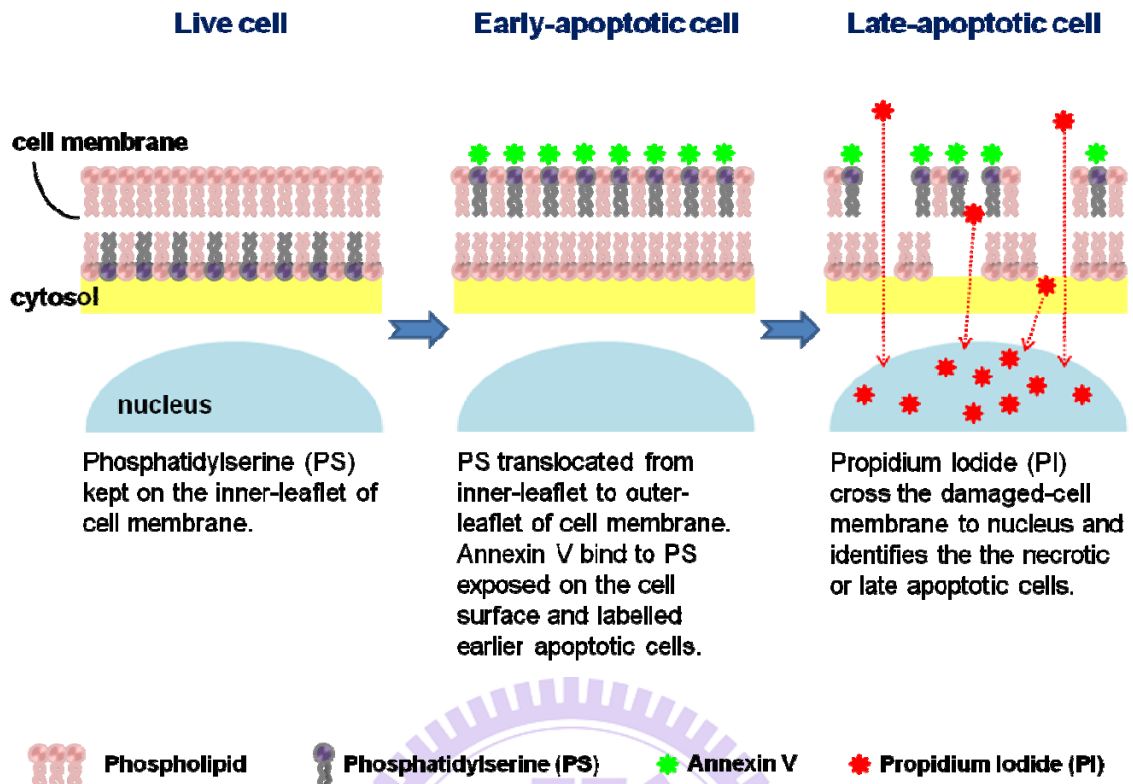


圖 34、Annexin V/PI 細胞雙染色法原理示意圖

### 貳-3-11 流式細胞儀 (Flow cytometer)

流式細胞儀結合了顯微鏡之發展、血球計數器之演進、電腦用印表機之噴墨技術作為發展的基礎，以快速偵測流動於其流體系統管柱中單顆細胞個別之訊號為目標。在流式細胞儀中所偵測之訊號是以單一顆細胞或者顆粒為主，而非一個群體之訊號，在單顆細胞分別通過其流體系統，將被雷射光做激發而使得帶有螢光物質之細胞或顆粒產生光學訊號，使訊號轉換成電子訊號後傳送至電腦軟體中來做分析，此又稱做 FACS 之系統。

在 FACS 之儀器中，主要是由流體學系統 (fluidics)、光學系統 (optics) 與電子系統 (electronics) 所組成。流式細胞儀之流體系統可將散布於三度空間的腔體中之群體細胞，有順序性並分成單一顆粒流過雷射光激發處與偵測器，一般常見之流體系統為正壓設計，加壓後使細胞通過只能容納單一顆細胞大小的管柱內；當單一細胞顆粒經過雷射光，被雷射光激發後的細胞將產生前散射光 (forward scatter, FSC) 與側向散射光 (side scatter, SSC)；此時，帶有螢光物質或抗體的細胞或是本身含有螢光物質的顆粒會產生不同波長之螢光，由偵測得到之螢光波長計算其螢光強度，則可由計算、統計而得與 FSC 成正比之顆粒大小、正比於 SSC 之顆粒性質以及欲偵測之螢光物質或螢光抗體結合後之強度。



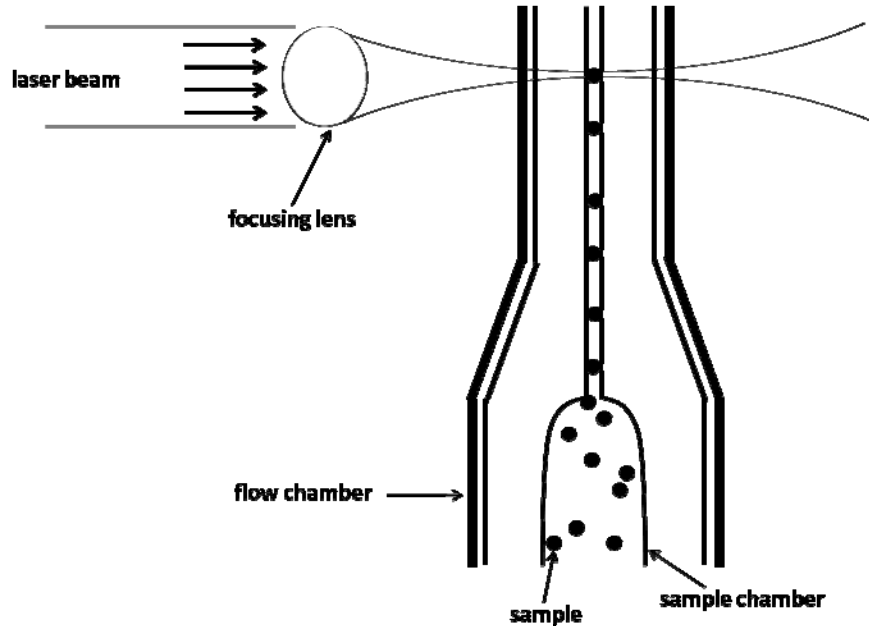


圖 35、流式細胞儀示意圖

Laser beam 表式雷射激發光束，箭頭為其光源方向；focusing lens 為聚焦透鏡，可使光束在樣品細胞留過之位置做激發；flow chamber 為流室細胞儀內流腔，而 sample chamber 則為樣品細胞流過之空間。



## 貳、第四章 實驗材料與方法

### 貳-4-1 實驗材料

#### 貳-4-1-1 細胞株來源

本實驗所使用之細胞株為人類乳癌細胞株 (human breast cancer cell line) MCF-7、人類急性單核血癌細胞株 (human acute monocyte leukemia cell line) THP-1 以及人類臍靜脈內皮細胞 (human umbilical vein endothelial cell) HUVECs 皆購自於生物資源保存及研究中心 (Bioresource Collection and Research Center, BCRC)。

主要使用之細胞株-MCF-7 為 Michigan Cancer Foundation-7 之縮寫，1970 年分離自一 69 歲高加索女人，由 Herbert Soule 等人建立於 1973 年，為一雌激素受體與黃體酮正向表達之浸潤性乳腺導管癌 (invasive ductal carcinoma, IDC) [290-292]。

浸潤性腺管癌 (infiltrating ductal carcinoma) 為最常見及最具有代表性的乳癌，約佔所有乳癌的 83%~89.8%。此時，癌細胞已經穿出腺管的基底膜之外，有時因為基質 (stroma) 受到浸潤、產生纖維化，造成所謂的硬癌 (scirrhous carcinoma)。

### 貳-4-2 實驗方法

#### 貳-4-2-1 蛋白質之表現與純化

(一) pSJF2-sdAb：取出冷凍於  $-80^{\circ}\text{C}$  中 pSJF2-sdAb 之菌株凍管，待菌液回溶後吸取  $30\ \mu\text{l}$  混合於  $3\ \text{ml}$  LB 培養基(含有  $20\ \mu\text{l/ml}$  之抗生素)，置於  $37^{\circ}\text{C}$  恆溫培養箱中以中轉速搖晃菌液使其活化，待 4~6 小時細菌生長至對數期 (log phase)，將菌液以 1:1,000 稀釋於  $250\ \text{ml}$  LB 培養液(含有  $20\ \mu\text{l/ml}$  之抗生素)當中，置於  $37^{\circ}\text{C}$  恆溫培養箱中以中高轉速搖晃菌液 3~4 小時，而後離心  $10,000\ \text{g}$  收取細菌之上清液。破菌後，離心收取蛋白質，並以 His-tag column 純化出 sdAb。

(二) pTT5-HCAb：先小量培養哺乳動物細胞 293-6E 於 293-SFM (Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada) 細胞培養液中，使其細胞密度為  $2.5 \times 10^5\ \text{cells/ml}$  於  $500\ \text{ml}$  之細胞培養瓶，並置於  $37^{\circ}\text{C}$  恆溫培養箱中之定軌振盪器，以轉速  $120\ \text{g}$ 、 $5\% \text{CO}_2$  培養之。約 48 小時後，細胞會生長至密度約  $1 \times 10^6\ \text{cells/ml}$ 。此時，將細胞移至含有  $375\ \text{ml}$  新鮮細胞培養液之  $2\ \text{L}$  細胞培養瓶中，使其細胞密度約為  $2.5 \times 10^5\ \text{cells/ml}$ 。待細胞生長至密度約為  $1.5 \times 10^6\ \text{cells/ml}$  即可為實驗所使用。

準備兩管各裝有  $25\ \text{ml}$  新鮮細胞培養液之  $50\ \text{ml}$  離心管，分別在管中加入  $375\ \mu\text{l}$  之載體 DNA (plasmid DNA) 與  $750\ \mu\text{l}$  之聚乙炔亞胺並均勻混合之。而後將含有載體 DNA 之溶液加入含有聚乙炔亞胺之溶液中，兩者輕輕混合均勻後靜置於室溫 15 分鐘。時間到，將混合液緩慢滴入細胞培養盤中，將細胞培養瓶置於  $37^{\circ}\text{C}$  恆溫培養箱中之定軌振盪器作用 6~24 小時，加入  $25\ \text{ml}$   $20\% \text{TN1}$  至細胞培養液中繼續培養。細胞培養 5~7 天中，確定細胞之活性，收取細胞培養之上清液，以  $1,000\ \text{g}$  離心 15 分鐘。而後以 protein-G column 純化出 HCAb。

#### 貳-4-2-2 細胞培養

MCF-7 以及 THP-1 兩種細胞株皆以含有 10% 胎牛血清、100 unit/ml 盤尼西林以及 100 mg/ml 鏈黴素之 RPMI-1640 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 培養液做培養，並於 5% 二氧化碳、95% 濕度以及 37 °C 恆溫環境之培養箱中生長；而 HUVECs 細胞株以含有 20% 胎牛血清、1% 內皮細胞生長補充劑 (endothelial cell growth supplement, ECGS)、100 unit/ml 盤尼西林以及 100 mg/ml 鏈黴素之 DMEM (Dulbecco's modified eagle medium; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 培養液做培養，並於 5% 二氧化碳、95% 濕度以及 37 °C 恆溫環境之培養箱中生長。平均每 2~3 天更換一次培養液，並於細胞生長至約 80~90% 滿時進行繼代培養與分盤。

細胞繼代培養與分盤：(一) 黏附型細胞 MCF-7 以及 HUVECs 係以吸排器移除舊的細胞培養液，加入適量 1X PBS 潤洗細胞一至二次後移除 1X PBS，取適量胰蛋白酶-乙二胺四乙酸均勻加入盤中，置入 37 °C 恆溫培養箱中反應，使細胞脫離盤底成亮圓單顆粒狀後，加入與胰蛋白酶-乙二胺四乙酸等量之細胞培養液，使其終止胰蛋白酶之作用，將盤中細胞沖吸始均勻分離成單顆，收集至離心管中以 1,500 g 離心 5 分鐘。移除上清液，添加適量培養液重新使細胞均勻懸浮，而後進行細胞計數或直接吸取適量細胞液至培養盤中，放置於 37 °C 恆溫培養箱中繼續培養；(二) 懸浮型細胞 (suspension cell) THP-1 係將細胞即細胞培養液移至離心管中，以 1,500 g 離心 5 分鐘。離心完移除上清液，加入適量新鮮細胞培養液重新均勻的懸浮細胞，而後進行細胞計數或直接吸取適量細胞液至培養盤中，放置於 37 °C 恆溫培養箱中繼續培養。

#### 貳-4-2-3 細胞活性分析

將密度為  $5 \times 10^3$  cells/well 之 MCF-7 細胞株培養於 96 孔細胞培養盤 (Orange Scientific, Braine-l'Alleud, Belgium) 中 24 小時，而後加入適當劑量之抗體 2A3、2A3-Fc、HER-2、HER-2-Fc 以及歐洲紫杉醇(又名多烯紫杉醇或多西紫杉醇；英文名稱: docetaxel) 於 starvation medium 以及 37 °C 恆溫培養箱中培養 72 小時。以 MTT 試劑分析細胞活性：將 5 mg/ml MTT 試劑以 1:10 稀釋並均勻混合於新鮮 starvation medium 中，移除原先盤內之舊的細胞培養液，再以八爪微量吸管吸取 100  $\mu$ l/well 輕輕滴入孔盤中，將 96 孔細胞培養盤放置於 37 °C 恆溫培養箱中反應 4 小時。4 小時後，吸除含有 MTT 試劑之舊培養液，同時加入 100  $\mu$ l/well DMSO 並將細胞盤置於振盪器上使 DMSO 均勻與細胞作用，待 1~3 分鐘後 DMSO 溶出活細胞中之 formazan，利用微量孔盤分析儀分析 O.D.565 之強度，並進一步計算出細胞活性與存活率。

#### 貳-4-2-4 藉由免疫細胞化學染色偵測 CEACAM6 與 HER-2 於細胞內之表現

將 MCF-7 細胞株以  $5 \times 10^5$  cells/well 培養於內含有一片蓋玻片且直徑為 3.5 cm 之細胞培養盤 (Orange Scientific, Braine-l'Alleud, Belgium) 中，並於 37 °C 恆溫培養箱中培養 24 小時。取出細胞培養盤並移除盤中舊的細胞培養液，以 1 ml 1X PBS 潤洗細胞兩次後移除 PBS。加入 1 ml 4% paraformaldehyde 於 37 °C 恆溫培養箱中 1 小時以固定細胞，移除 paraformaldehyde 並以 1 ml 1X PBS 潤洗細胞兩次後移除 PBS，加入 1 ml blocking

solution (以 10% FBS、0.25% Triton X-100 均勻溶解於 1X PBS) 於 37°C 恆溫培養箱中作用 1 小時，競爭結合上非特異性抗原結合位置，並增加細胞膜之通透性。以 1 ml wash buffer (1X PBS 內含 0.25% Tween-20) 放置於 shaker 緩慢搖晃，在室溫下清洗 10 分鐘並重複 3 次。加入稀釋 50 倍之 CEACAM6 以及 HER-2 之一級抗體，於 37°C 恆溫培養箱中作用 1 小時。以 1 ml wash buffer 放置於 shaker 緩慢搖晃，在室溫下清洗 10 分鐘並重複 3 次。加入事先稀釋 20 倍之接有紅色螢光的二級抗體，於 37°C 恆溫培養箱中作用 0.5 小時。以 1 ml wash buffer 放置於 shaker 緩慢搖晃，在室溫下清洗 10 分鐘並重複 3 次。加入稀釋 100 倍之細胞核染劑 Hoechst 33342 (Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada)，於 37°C 恆溫培養箱中作用 0.5 小時。以 1 ml wash buffer 放置於 shaker 緩慢搖晃，在室溫下清洗 10 分鐘並重複 3 次。再以 1 ml 1X PBS 放置於 shaker 緩慢搖晃，在室溫下潤洗 10 分鐘並重複 3 次。準備乾淨之載玻片，於其中間滴上約 20~30  $\mu\text{l}$  之 mounting medium (ibidi GmbH, Martinsried, Germany)，擦乾蓋玻片周圍多餘水分後，將有細胞面朝下以 45° 角蓋在 mounting medium 上(避免產生氣泡)，並以指甲油封住蓋玻片周圍，以螢光顯微鏡觀察並拍照、分析圖檔。

#### 貳-4-2-5 基質金屬蛋白酶活性分析

將 MCF-7 細胞株以  $5 \times 10^3$  cells/well 培養於 96 孔細胞培養盤中，並於 37°C 恆溫培養箱中培養 24 小時。第二天分別序列稀釋抗體 0~20  $\mu\text{m}$  2A3、2A3-Fc、HER-2、HER-2-Fc 以及 0~20 nm 歐洲紫杉醇於 starvation medium 中，移除舊的細胞培養液後，以 100  $\mu\text{l}$ /well 含有抗體或藥物之細胞培養液加入細胞中，於 37°C 恆溫培養箱中作用 72 小時。72 小時後，收取細胞培養液置於冰上備用。

事先製備含有 1.5 mg/ml gelatin 的 10% SDS-PAGE，同時將水的部分以 33% glycerol 取代。將置於冰上之細胞培養液樣品適量與不含有  $\beta$ -ME 之蛋白質樣品液混合均勻，於 50~60 °C 靜置 5~10 分鐘，取出樣品於 4 °C 冰上放置 5~10 分鐘後按照順序注入含有 1.5 mg/ml gelatin 的 10% 蛋白質膠中，以 80 V 跑上膠 30 分鐘，140 V 跑下膠至底。以二次水配置含有 2.5% Triton X-100 之溶液，收下跑好的蛋白質膠，將其以 2.5% Triton X-100 於室溫下輕輕搖晃洗除蛋白質膠中所含之 SDS，每次洗 30 分鐘，共洗 4 次。配置 development buffer，內含有 50 mM Tris-HCl、0.2 M NaCl、5 mM  $\text{CaCl}_2$ 、5  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$ 、0.02% Brij-35 以及 0.05%  $\text{NaN}_3$ ，並調整 pH 值使為 7.4。將移除 SDS 後之蛋白質膠體以 1X PBS 潤洗一次後，加入 development buffer 於 37°C 恆溫培養箱中緩慢搖晃 16~24 小時。取出蛋白質膠體，以蛋白質染劑考馬氏藍進行染色 1~3 小時，而後以 50% 甲醇及 10% 乙酸退染 5~10 分鐘，再以 5% 甲醇及 7% 乙酸退染 24 小時使對比明顯。此時，蛋白質膠上被明膠酵素 MMP-2 與 MMP-9 消化處會呈現透明色，與背景的深藍色成為對比，而透明處則可作分析 MMP-2 與 MMP-9 活性之依據，並掃描下結果。

#### 貳-4-2-6 單核細胞趨化蛋白表現分析

將 MCF-7 細胞株以  $5 \times 10^3$  cells/well 培養於 96 孔細胞培養盤中，並於 37°C 恆溫培養箱中培養 24 小時。第二天分別序列稀釋抗體 0~20  $\mu\text{m}$  2A3、2A3-Fc、HER-2、HER-2-Fc



以及 0~20 nm 歐洲紫杉醇於 starvation medium 中，移除舊的細胞培養液後，以 100  $\mu$ l/well 含有抗體或藥物之細胞培養液加入細胞中，於 37°C 恆溫培養箱中作用 24 小時。24 小時後，收取細胞培養液置於冰上備用。

事先製備 15% SDS-PAGE，將置於冰上之細胞培養液樣品適量與含有  $\beta$ -ME 之蛋白質樣品液混合均勻，於 100 °C 破壞蛋白質結構 5~10 分鐘，取出樣品於 4°C 冰上放置 5~10 分鐘後按照順序注入 15% 蛋白質膠中，以 80 V 跑上膠 30 分鐘，140 V 跑下膠至藍色染劑距離膠底 0.1 公分。收取跑完電泳之蛋白質膠片，將蛋白質轉漬於 PVDF membrane 上，轉漬完成之 PVDF membrane 浸泡於 5% 脫脂牛奶於室溫下緩慢搖晃 1 小時，競爭非抗體、抗原專一性結合之位置。將轉漬膜加入以 5% 脫脂牛奶稀釋 1,000 倍之 anti-mouse MCP-1 之一級抗體，於 4°C 冷房中緩慢並均勻搖晃隔夜，而後於室溫下以 wash buffer-1X TBST 清洗轉漬膜，每次 10 分鐘，共重複洗 3 次。加入以 5% 脫脂牛奶稀釋 5,000 倍之 goat anti-mouse conjugate HRP 之二級抗體，於室溫下緩慢並均勻的搖晃 1 小時，而後於室溫下以 1X TBST 清洗轉漬膜，每次 10 分鐘，共重複洗 3 次。將轉漬膜以 HRP 之反應基質 ECL 反應 30 秒後，於暗房中依順序以藍底片曝光數秒至數分鐘，而後顯影、定影並風乾底片以掃描機 (V750, EPSON, Osaka, Japan) 掃描結果。

#### 貳-4-2-7 細胞浸潤能力分析

將 MCF-7 細胞株以  $2 \times 10^4$  cells/well 培養於 24 孔細胞培養盤中，並於 37°C 恆溫培養箱中培養 24 小時。第二天移除舊的細胞培養液後，分別處理 20  $\mu$ M 2A3、2A3-Fc、HER-2、HER-2-Fc 以及 20 nM 歐洲紫杉醇於 starvation medium 中，並以一組為無血清無藥物處理、一組為含 5% 胎牛血清無藥物處理者為控制組，於 37°C 恆溫培養箱中作用 24 小時。第三天加入  $1 \times 10^4$  cells/well 單核球細胞 THP-1 使之於 37°C 恆溫培養箱中作用 24 小時。第四天均勻加入 1  $\mu$ l/ml calcein AM 螢光染劑於 insert well (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) 中，並於 37°C 恆溫培養箱中作用 1 小時使細胞噬入染劑，反應時間到以手術刀割下 insert well 下方之 membrane，以螢光顯微鏡觀察綠色螢光之表現並拍照計數(見圖 36)。



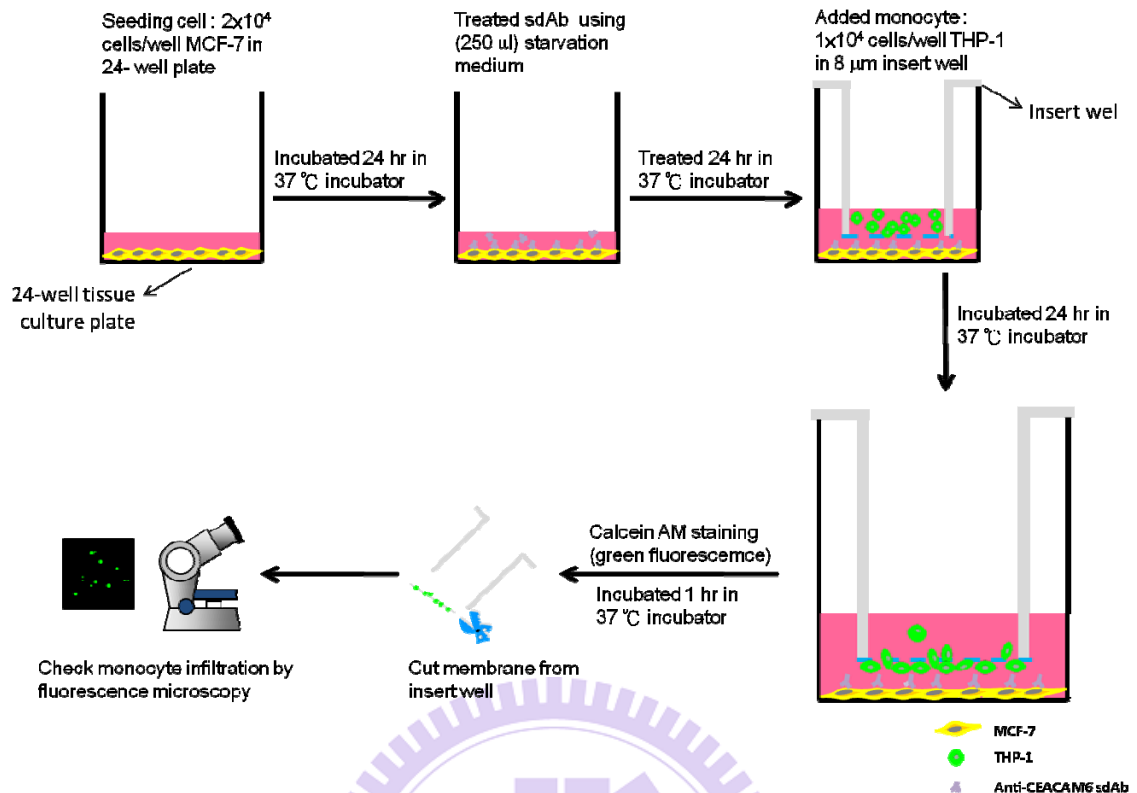


圖 36、單核球細胞浸潤乳癌能力分析實驗流程圖

#### 貳-4-2-8 細胞基質侵蝕力分析

於實驗前一天事先取出 metrigel (Reduced Growth Factor Basement Membrane Matrix; GIBCO, Carlsbad, CA, USA) 於  $4^\circ\text{C}$  冰箱中解凍，使之於  $4^\circ\text{C}$  時呈現液態，並以 10,000 g 高速離心去除其中之氣泡。製備 50  $\mu\text{l}$ /well 厚之 metrigel 於 insert well 中，並放置室溫 15~30 分鐘使其凝固成型。

將製備完成之 insert well 放置於內含 100  $\mu\text{l}$  starvation medium 之 24 孔盤上方，加入  $1 \times 10^5$  cells/well MCF-7 細胞，同時分別處理 10  $\mu\text{M}$  2A3、2A3-Fc、HER-2、HER-2-Fc 以及 10 nM 歐洲紫杉醇於 starvation medium 中，並以一組為無血清無藥物處理、一組為含 5% 胎牛血清無藥物處理者為控制組，於  $37^\circ\text{C}$  恆溫培養箱中作用 24 小時。第二天均勻加入 1  $\mu\text{l}/\text{ml}$  calcein AM 螢光染劑於 insert well 中，並於  $37^\circ\text{C}$  恆溫培養箱中作用 1 小時使細胞噬入染劑，反應時間到移除 insert well 內之 metrigel，而後以手術刀割下 insert well 下方之 membrane，以螢光顯微鏡觀察綠色螢光之表現並拍照計數(見圖 37)。

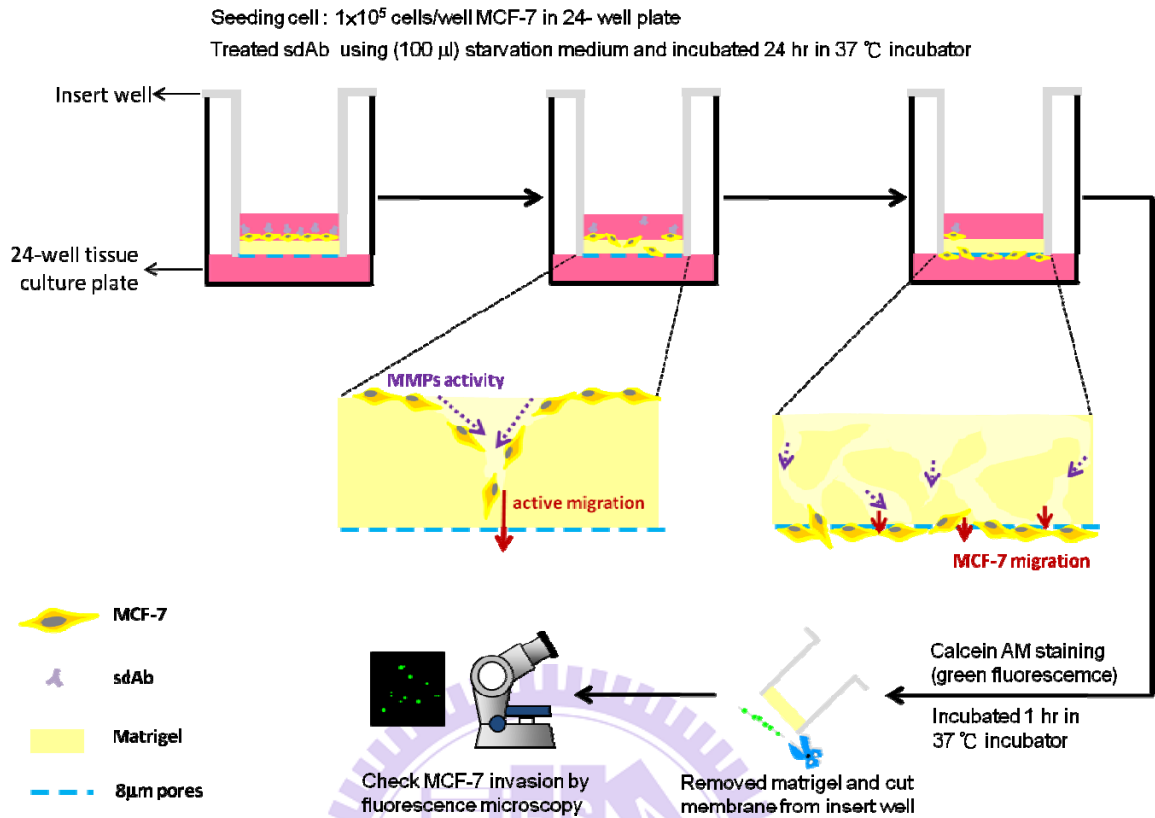


圖 37、乳癌細胞侵蝕細胞基質能力分析實驗流程圖

#### 貳-4-2-9 血管新生能力測試

將 MCF-7 細胞株以  $2 \times 10^5$  cells/well 培養於 24 孔細胞培養盤中，並於 37 $^{\circ}$ C 恆溫培養箱中培養 24 小時。第二天移除舊的細胞培養液後，分別處理 10  $\mu$ M 2A3、2A3-Fc、HER-2、HER-2-Fc 以及 10 nM 歐洲紫杉醇於 starvation medium 中，並以一組加有 10  $\mu$ M haptoglobin、一組為無血清無藥物處理、一組為含 5% 胎牛血清無藥物處理者為控制組，於 37 $^{\circ}$ C 恆溫培養箱中作用 24 小時。事先取出 matrigel 於 4 $^{\circ}$ C 冰箱中解凍，使之於 4 $^{\circ}$ C 時呈現液態，並以 10,000 g 高速離心去除其中之氣泡。第三天製備 100  $\mu$ l/well 厚之 matrigel 於 insert well 中，並放置室溫 15~30 分鐘使其凝固成型。將製備完成之 insert well 放置於含有 100  $\mu$ l starvation medium 之 24 孔盤上方，取 100  $\mu$ l 處理完 MCF-7 細胞之細胞培養液分別加入 insert well 內，並加入  $5 \times 10^4$  cells/well 上皮細胞 HUVECs (含 5% 胎牛血清) 使之於 37 $^{\circ}$ C 恆溫培養箱中作用 12~18 小時。第四天均勻加入 1  $\mu$ l/ml calcein AM 螢光染劑於 insert well 中，並於 37 $^{\circ}$ C 恆溫培養箱中作用 1 小時使細胞噬入染劑，反應時間到以手術刀割下 insert well 下方之 matrigel 與 membrane，以螢光顯微鏡觀察綠色螢光之表現並拍照計數(見圖 38)。

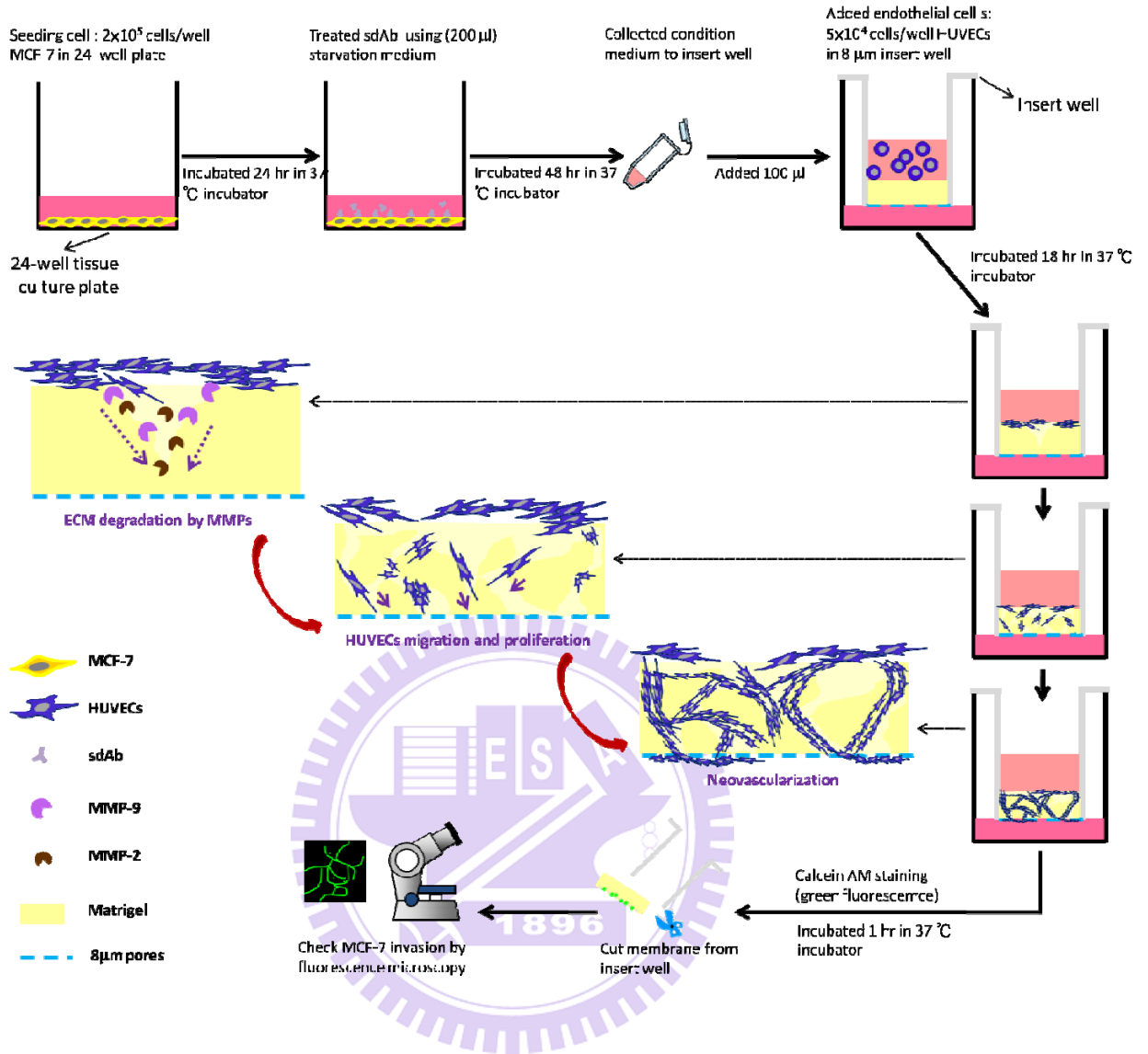


圖 38、上皮細胞血管新生能力分析實驗流程圖

#### 貳-4-2-10 利用西方墨點法偵測細胞訊息傳遞及凋亡蛋白之表現

將 MCF-7 細胞株以  $5 \times 10^5$  cells/well 培養於直徑 6 公分之細胞培養盤中，並於 37°C 恆溫培養箱中培養 24 小時。第二天移除舊的細胞培養液後，分別處理 5 µM 2A3、2A3-Fc、HER-2、HER-2-Fc 以及 10 nM 歐洲紫杉醇於 starvation medium 中，並以一組為無血清無藥物處理、一組為含 5% 胎牛血清無藥物處理者為控制組，於 37°C 恆溫培養箱中作用 72 小時。72 小時後，移除細胞培養液，以 1 ml 1X PBS 潤洗細胞並吸除廢液(重複兩次)，加入 50 µl 細胞裂解溶液 (cell lysis buffer)，將細胞置於冰上同時以細胞刮勺刮下細胞，收集細胞於微量離心管，於 4 °C 以中速震盪 30 分鐘，取出樣品以 12,000 g 離心 10 分鐘，離心完成後收集上清液即為細胞內之總蛋白。以 BSA 作為標準品，使用 Bradford method 進行蛋白質定量，並保存蛋白質於 -20°C 冰箱中備用。

事先製備含有適當 acrylamide 百分比之 SDS-PAGE，將細胞內蛋白質樣品適量與含有 β-ME 之蛋白質樣品液混合均勻，於 100 °C 破壞蛋白質結構 5~10 分鐘，取出樣品於

4°C 冰上放置 5~10 分鐘後按照順序注入蛋白質膠中，以 80 V 跑上膠 30 分鐘，140 V 跑下膠至藍色染劑距離膠底 0.1 公分。收取跑完電泳之蛋白質膠片，將蛋白質轉漬於 PVDF membrane 上，轉漬完成之 PVDF membrane 浸泡於 5 % 脫脂牛奶於室溫下緩慢搖晃 1 小時，競爭非抗體、抗原專一性結合之位置。將轉漬膜加入以 5 % 脫脂牛奶稀釋之一級抗體，於室溫下緩慢搖晃 2 小時或於 4°C 冷房中緩慢並均勻搖晃隔夜，而後於室溫下以 wash buffer-1X TBST 清洗轉漬膜，每次 10 分鐘，共重複洗 3 次。加入以 5 % 脫脂牛奶稀釋之二級抗體，於室溫下緩慢並均勻的搖晃 1 小時，而後於室溫下以 1X TBST 清洗轉漬膜，每次 10 分鐘，共重複洗 3 次。將轉漬膜以 HRP 之反應基質 ECL 反應 30 秒後，於暗房中依順序以藍底片曝光數秒至數分鐘，而後以顯影劑顯影、過清水潤洗掉顯影劑、以定影劑定影，風乾底片後以掃描機 (V750, EPSON, Osaka, Japan) 掃描結果。

#### 貳-4-2-11 利用 Annexin V/PI 雙染色並以流式細胞儀進行細胞凋亡分析

將 MCF-7 細胞株以  $5 \times 10^5$  cells/well 培養於直徑 6 公分之細胞培養盤中，並於 37°C 恆溫培養箱中培養 24 小時。第二天分別處理 5  $\mu$ M 2A3、2A3-Fc、HER-2、HER-2-Fc 以及 10 nM 歐洲紫杉醇於 starvation medium 中，移除舊的細胞培養液後，並以一組為無血清無藥物處理、一組為含 5 % 胎牛血清無藥物處理者為控制組，於 37°C 恆溫培養箱中作用 72 小時。

72 小時後，將舊的細胞培養液收集於 15 ml 離心管中，以 1 ml 1X PBS 潤洗細胞盤兩次並移除廢液，加入 0.5 ml trypsin-EDTA 反應 1 分鐘，吸取等量之舊細胞培養液沖下細胞，以 1,500 g 離心 5 分鐘，移除上清液。自於 4°C 冰箱中取出細胞凋亡偵測套組 (FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit II; BD Pharmingen, San Diego, CA, USA)，以 500  $\mu$ l/sample 反應溶液 (reaction buffer) 加入離心管中，輕輕打散並使細胞為單一顆粒，加入 10  $\mu$ l Annexin V 與 PI 之等量混合液混合均勻，於室溫下避光反應 5 分鐘。5 分鐘後，將細胞通過細胞濾膜使之成為單一細胞顆粒並收集於流式細胞儀之樣品管中，避光待上機、分析。

## 貳、第五章 實驗結果

### 貳-5-1 sdAb 與 HCAb 抗體表現與純化

(一) 將建構完成之 pSJF2-sdAb 2A3 質體表現於大腸桿菌菌株 TG1 中，以 IPTG 誘導 4 小時，離心取上清液進行破菌，破菌完成之產物以 11,000 g 速度離心 5 分鐘，收集上清液即為所需之 sdAb 2A3 蛋白質。以固定化金屬親和性層析法 (immobilize metal affinity chromatography) 純化 C-端帶有 His-tag 之目標蛋白質，可得到純度大於 95 % 之 sdAb 2A3，並且每一公升之菌液可生產大於 25 mg 之 sdAb 2A3 蛋白質(圖 39 (A))。

(二) 將 HCAb 2A3-Fc 選殖進入 pTT5 哺乳動物表現系統，構築完成之 pTT5-HCAb 2A3-Fc 質體以 PEI 轉染至 293-6E 細胞中。收集細胞培養液並以 1,000 g 離心 15 分鐘，收取上清液以 G-蛋白親和性層析管柱純化 HCAb 2A3-Fc，最終可得純度大於 95 % 之 HCAb 2A3-Fc，且每一公升之菌液可生產大於 30 mg 之 sdAb 2A3 蛋白質(圖 39(B))。

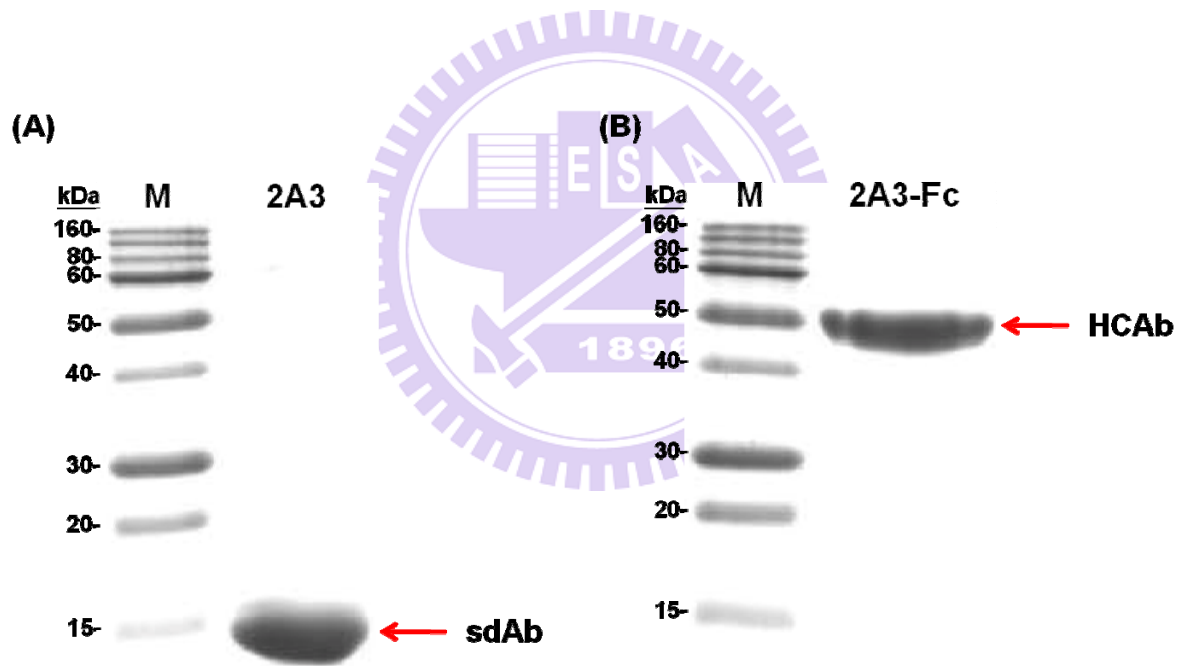


圖 39、2A3 與 2A3-Fc 抗體之表現

利用 His-tag column 純化 2A3 與 2A3-Fc 抗體，並以西方墨點法確定其抗體之表現與純度。圖(A) 箭頭指出 sdAb 2A3 分子量約為 16 kDa；圖(B) 箭頭指出 HCAb 2A3-Fc 分子量約為 68 kDa。經由親和性層析純化後兩者之純度皆大於 95 %。其中，M 為蛋白質分子量標準溶液；2A3 為單一抗原結合功能區抗體；2A3-Fc 為重鏈抗體。



## 貳-5-2 HER-2 與 CEACAM6 蛋白質表現於 MCF-7 與 THP-1 細胞中

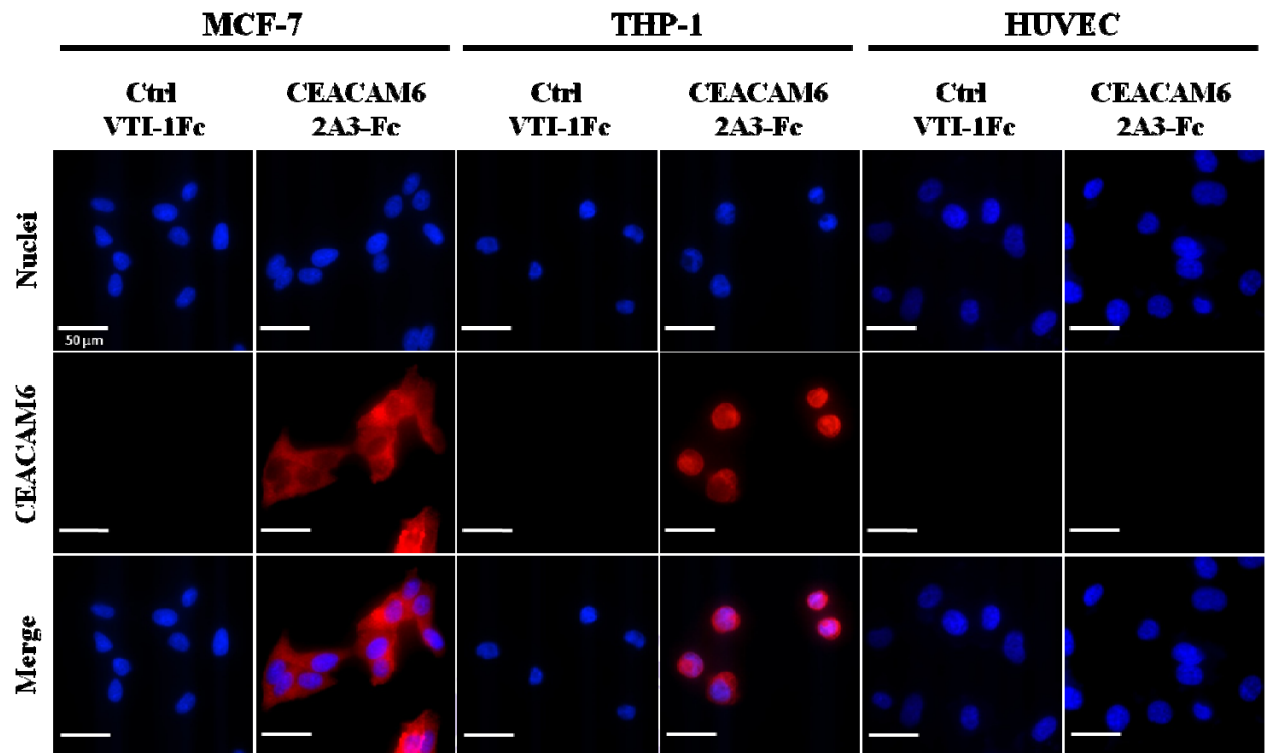
為了確認人類乳癌細胞株 MCF-7、人類急性單核白血病細胞株 THP-1 與人類臍靜脈內皮細胞株 HUVEC 等三株細胞中是否分別有 CEACAM6 或 HER-2 蛋白質的表達，故利用免疫細胞化學染色法與西方墨點法做檢測。

由圖 40(A)，在人類乳癌細胞株 MCF-7 和人類急性單核白血病細胞株 THP-1 中，由免疫細胞染色法所示之紅色螢光訊號可確定 CEACAM6 之大量表現，而人類臍靜脈內皮細胞株 HUVEC 則不表現 CEACAM6 蛋白；而圖 40(B)中之綠色螢光為 HER-2 之訊號，於人類乳癌細胞株 MCF-7 中確實高度表現 HER-2 之蛋白，同樣的條件下，於人類急性單核白血病細胞株 THP-1 與人類臍靜脈內皮細胞株 HUVEC 兩種細胞中則無看見 HER-2 之表現。

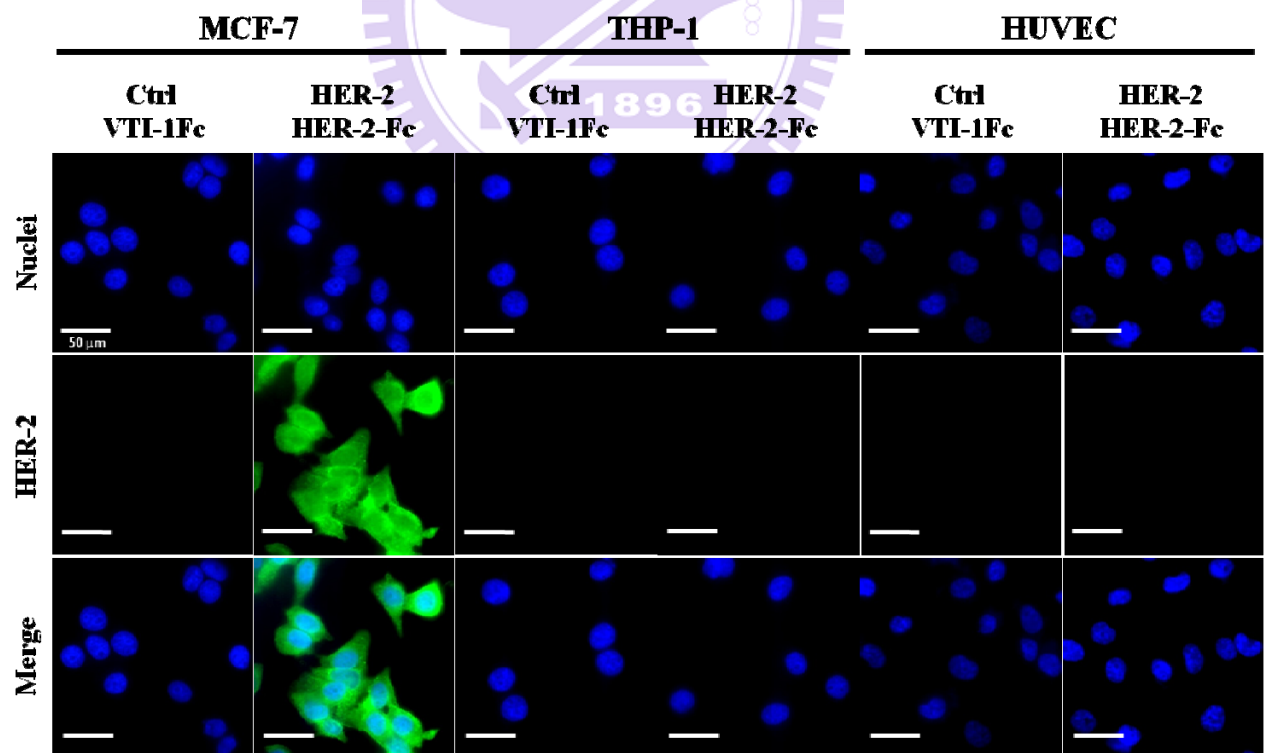
在圖 40(C)西方墨點法之結果，分別收取細胞內總蛋白 (如圖中所示為 C)以及細胞培養液 (如圖中所示為 M)作檢測：CEACAM6 為一分子量約 90 kDa 之蛋白質，表現於 MCF-7 乳癌細胞株及 THP-1 急性單核白血病細胞株內，而不表現於細胞培養液中；於 HUVEC 臍靜脈內皮細胞株，無論是細胞內蛋白或細胞培養液中皆不表現 CEACAM6 之蛋白。而 HER-2 蛋白質分子量約為 189 kDa，正向表現於 MCF-7 乳癌細胞株之細胞內，細胞培養液中則無其訊號；在 THP-1 急性單核白血病細胞株及 HUVEC 臍靜脈內皮細胞株，細胞內蛋白質與細胞培養液皆無 HER-2 之表達。



(A)



(B)



(C)

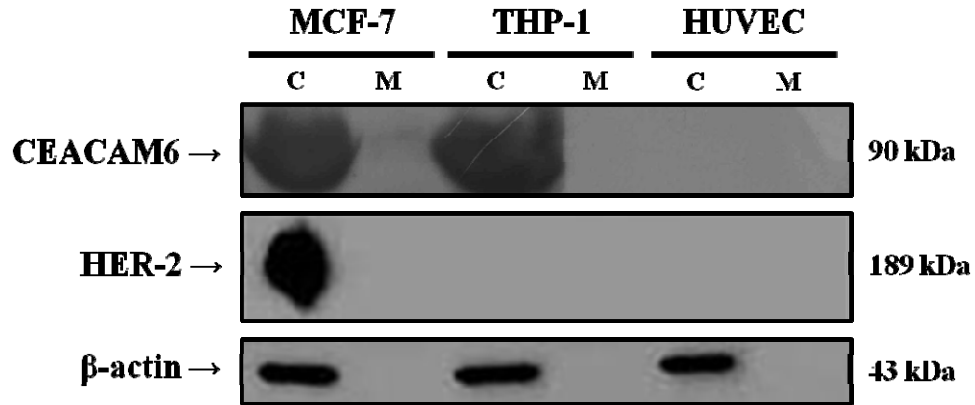


圖 40、觀察 MCF-7、THP-1 和 HUVEC 三種細胞株內之 HER-2 與 CEACAM6 表現

圖(A)、(B) 利用免疫細胞化學染色法以及螢光顯微鏡呈相來觀察細胞內之 CEACAM6 及 HER-2 表現。分別以  $3 \times 10^5$  cells/well MCF-7、THP-1、HUVEC 細胞培養於直徑 3.5 公分細胞培養盤 24 小時，第二天分別以各別之專一性抗體進行免疫細胞化學染色。其中，圖(A)將 Alexa 546 標記 anti-CEACAM6 一級抗體，為紅色螢光；Hoechst 33342 標記藍色螢光，表示細胞核所在；VTI1-Fc 作為負向控制組；圖(B) 以 FITC 標記 HER-2 位置，為綠色螢光；Hoechst 33342 標記藍色螢光，表示細胞核所在；VTI1-Fc 作為負向控制組。圖(C) 以西方墨點法確認細胞內之 CEACAM6 表現量；分別以  $1 \times 10^6$  cells/well MCF-7、THP-1、HUVEC 細胞培養於直徑 6 公分細胞培養盤 24 小時，第二天收取細胞培養液與細胞內總蛋白，以西方墨點法分析之。其中，C 表示樣品為細胞內之蛋白質；M 表示樣品為細胞培養液，也可視為負向控制組。

貳-5-3 anti-HER-2 抗體與 anti-CEACAM6 抗體抑制 MCF-7 細胞的增生及基質金屬蛋白酶的活性

以 MTT 法分析分別由 anti-CEACAM6 抗體 2A3、2A3-Fc 與 anti-HER-2 抗體 HER-2、HER-2-Fc 處理 MCF-7 乳癌細胞，經過 72 小時後對於細胞之活性與增生能力是否有影響。

由實驗結果(圖 41)顯示，乳癌細胞株 MCF-7 經由 anti-CEACAM6 抗體與 anti-HER-2 抗體處理後，皆有明顯抑制細胞增生能力的作用，其中：分別以 4.8  $\mu\text{M}$  之 2A3 及 2.8  $\mu\text{M}$  之 2A3-Fc 處理後，其細胞存活率降低至 49.9% 與 49.12%；而由 3.6  $\mu\text{M}$  之 HER-2 與 19.8  $\mu\text{M}$  之 HER-2-Fc 處理後，細胞活性分別降低至 47.58% 以及 48.7%；同樣也以歐洲紫杉醇做測試，其於大約 1 nM 之藥物處理 72 小時之後，使得細胞存活率降低 50% 左右。

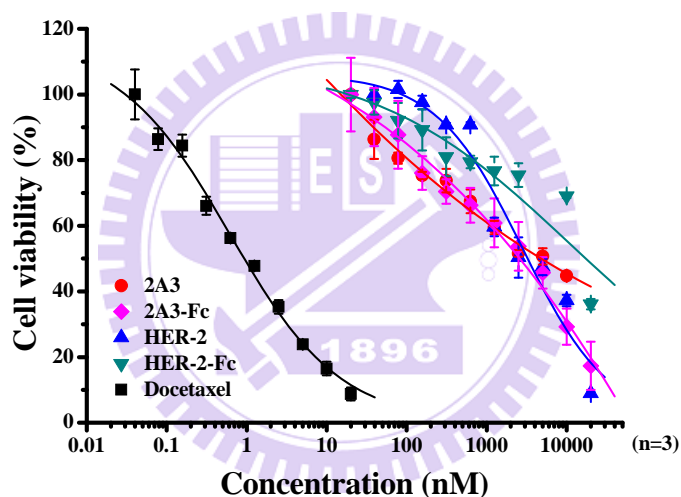


圖 41、細胞內 sdAb 2A3 與 HCAb 2A3-Fc 抑制細胞增生能力之分析

以 MTT 法分析 anti-CEACAM6 抗體對於 MCF-7 細胞株之影響，以  $5 \times 10^3$  cells/well MCF-7 細胞培養於 96 孔細胞培養盤 24 小時，第二天分別以 5  $\mu\text{M}$  sdAb 2A3、HCAb 2A3-Fc 以及 20 nM 歐洲紫杉醇處理細胞 72 小時於 starvation medium，並以單純加有 starvation medium 之細胞為控制組，第五天以 MTT 試劑與微量孔盤分析儀分析細胞存活率。圖中，橫軸為藥物處理 MCF-7 乳癌細胞之濃度，縱軸表示細胞存活能力。(n 值=3)

#### 貳-5-4 單一抗原結合功能區抗體誘導乳癌細胞 MCF-7 死亡之分析

利用 Annexin V/PI 染色分析法，可用於分析不同狀態之細胞，分析其所得之螢光訊號強度即可統計出活細胞、壞死細胞、凋亡早期細胞及凋亡晚期細胞。此實驗分別以 starvation medium 配置 10  $\mu$ M 之 sdAb 2A3、HER-2 及 HCAb 2A3-Fc、HER-2-Fc 與 10 nM 之歐洲紫杉醇，加入乳癌細胞 MCF-7，並於 37°C 細胞恆溫培養箱中處理 72 小時；而後收集所有細胞以 Annexin V/PI 作活細胞雙染色，並以流式細胞儀分析綠色螢光與紅色螢光之訊號。

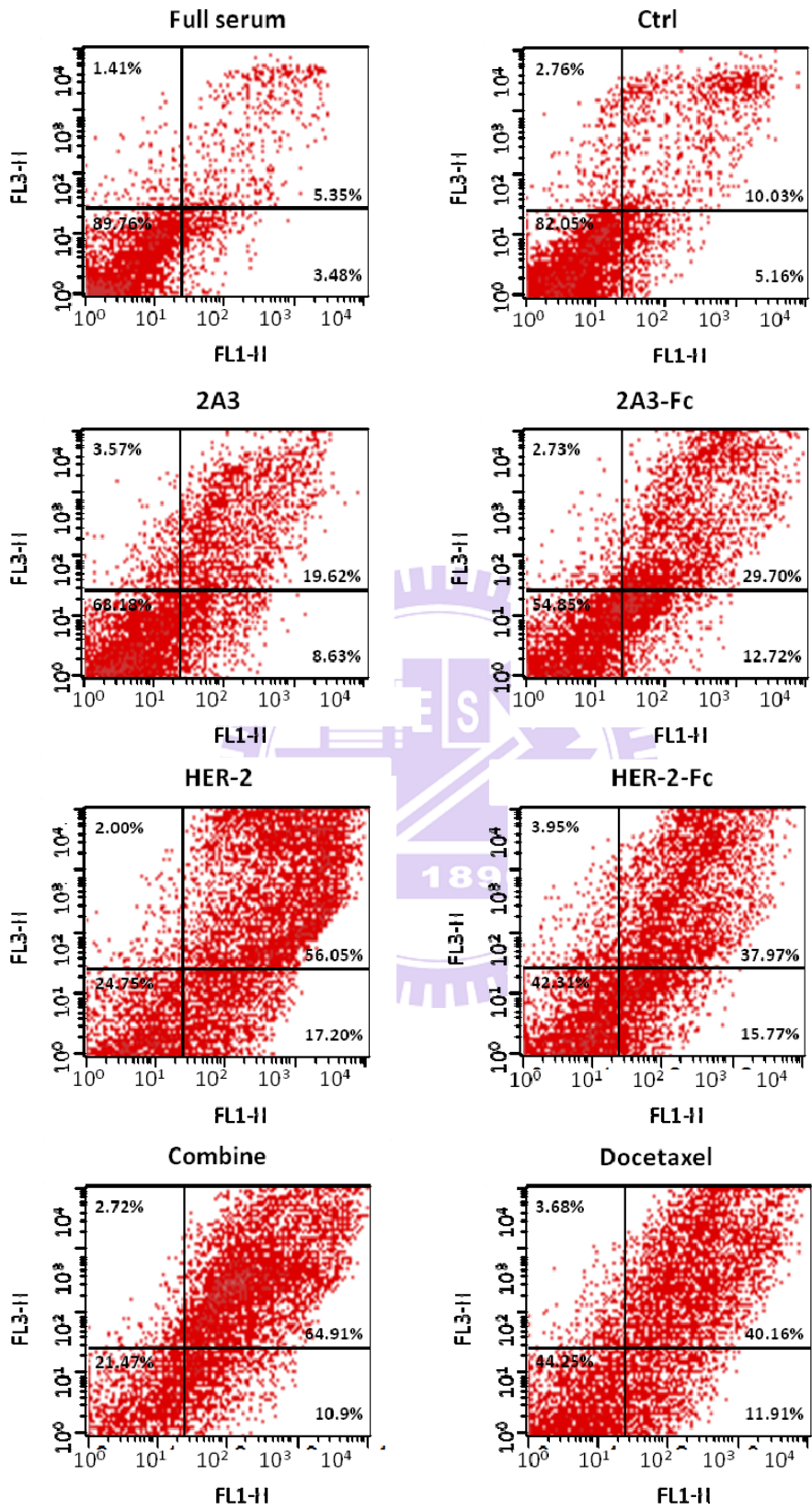
由圖 42(A)，紅色訊號代表所累加之細胞訊號，愈偏於灰色表示該訊號之細胞愈多。在 anti-CEACAM6 抗體 2A3 與 2A3-Fc 處理之細胞分別有 28.25% 及 42.42% 之細胞走向細胞凋亡，相對於控制組之 15.18%，細胞凋亡數量分別多了 13.07% 與 27.24%；經由 anti-HER-2 抗體 HER-2 與 HER-2-Fc 處理後之細胞，則各有 73.25% 與 53.74% 之細胞凋亡，此數據與控制組相比較後可得，處理了 HER-2-Fc 之細胞凋亡比例比控制組多 38.52%，而處理 HER-2 抗體之細胞其凋亡比例更是比控制組多出接近 60%；另外，同時以 2A3 抗體及 HER-2 抗體合併處理之 MCF-7 乳癌細胞，其細胞凋亡比例為 75.81%，相對於控制組更多了 60% 以上。而 10 nM 歐洲紫杉醇作用 72 小時之後，其造成細胞凋亡之比例也佔了 50% 以上。

並且由各圖中觀察出，anti-CEACAM6 抗體 2A3、2A3-Fc 與 anti-HER-2 抗體 HER-2、HER-2-Fc 對於 MCF-7 乳癌細胞接非常專一的誘導細胞走向細胞凋亡之細胞死亡路徑，而非細胞壞死路徑。

在圖 42(B)之統計分析數據中顯示了各實驗組與控制組比較下，MCF-7 細胞凋亡之比例：在 anti-CEACAM6 抗體的部分，2A3 較控制組多出近兩倍，而 2A3-Fc 則高出近三倍；同樣比較 anti-HER-2 抗體與控制組，值得一提的是 HER-2 誘導之細胞凋亡比例足足高於控制組五倍，且 HER-2-Fc 與合併處理 2A3 及 HER-2 之實驗組也分別的誘導較控制組多出近四倍以及超過四點五倍的細胞凋亡現象。



(A)



(B)

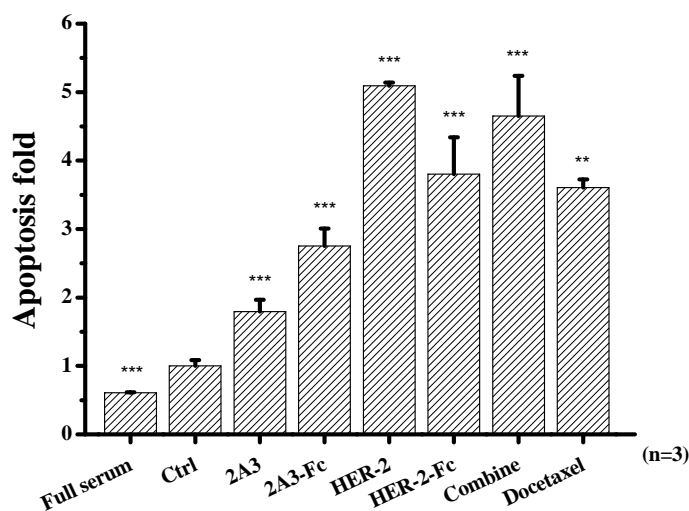


圖 42、以 Annexin V/PI 分析經由 sdAb 與 HCAb 處理 72 小時後之乳癌細胞 MCF-7

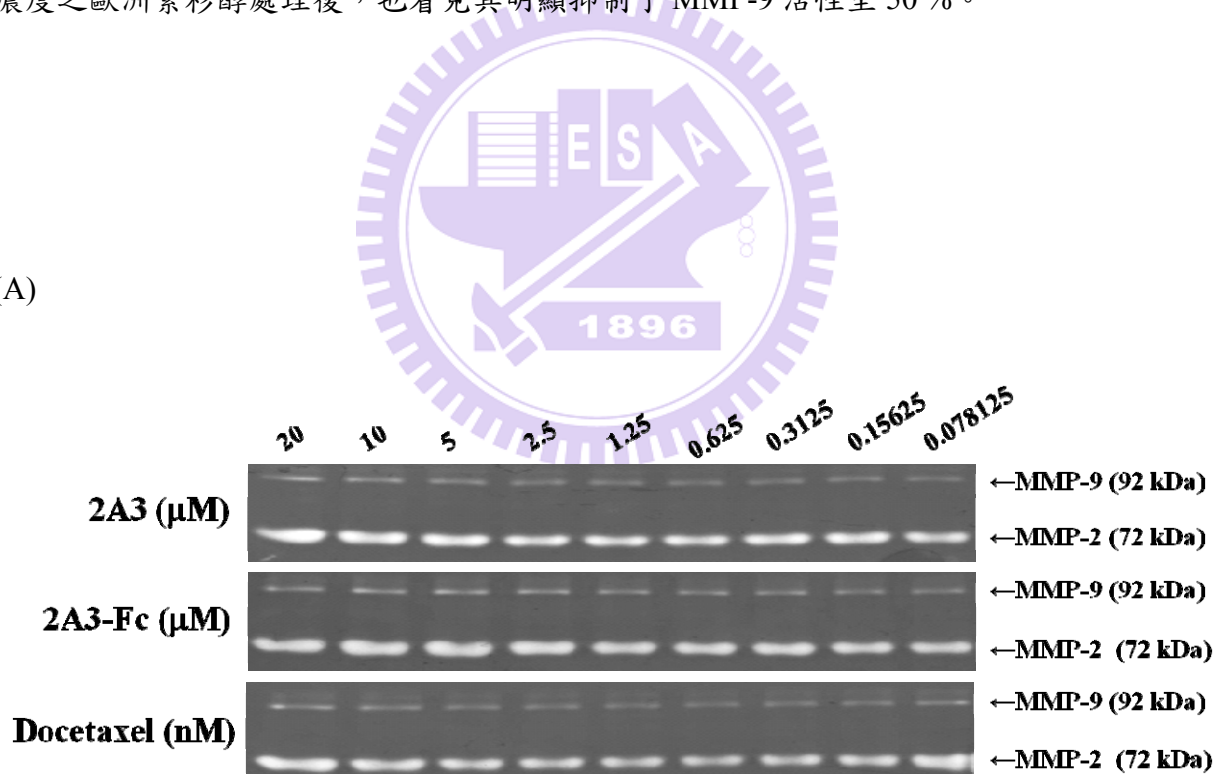
以  $3 \times 10^5$  cells/well MCF-7 細胞培養於直徑 3.5 公分之細胞培養盤 24 小時，第二天分別以  $10 \mu\text{M}$  之 2A3、2A3-Fc、HER-2、HER-2-Fc 抗體以及同時加入  $10 \mu\text{M}$  之 2A3 與 HER-2 抗體處理 72 小時；並以單純加入含有正常 10% FBS 胎牛血清細胞培養液培養之細胞以及單純加入 starvation medium 培養之細胞為對照組，另外，以處理 10 nM 歐洲紫杉醇之細胞為正向控制組。藥物作用 72 小時後，收取細胞培並 Annexin V/PI 法進行雙染色，5 分鐘後以流式細胞儀進行細胞死亡分析。圖(A)中，Full serum 為只以含有 10% 胎牛血清之細胞培養液培養之對照組；Ctrl 為單純以 starvation medium 培養之實驗控制組；2A3 為處理  $10 \mu\text{M}$  sdAb 2A3 實驗組；2A3-Fc 為處理  $10 \mu\text{M}$  HCAb 2A3-Fc 實驗組；HER-2 為處理  $10 \mu\text{M}$  sdAb HER-2 實驗組；HER-2-Fc 為處理  $10 \mu\text{M}$  HCAb HER-2-Fc 實驗組；Combine 為同時處理  $10 \mu\text{M}$  sdAb 2A3 與 HER-2 之實驗組；Docetaxel 為處理 10 nM 之實驗組。FL1-H 表示 Annexin V 所發出之 FITC 綠色螢光訊號；FL2-H 表示 PI (propidium iodide) 受激發後所發出之紅色螢光訊號；而圖中十字定量線之左下角為活細胞；左上角為壞死之細胞 (necrotic cell)；右下角為細胞凋亡早期之細胞 (early apoptotic cell)；右上角為細胞凋亡晚期之細胞 (late apoptotic cell)。圖(B)中，橫軸為各個抗體與藥物處理之實驗組，縱軸代表細胞凋亡總細胞相較於無血清添加之控制組之比例。(n 值=3；\*\* $p < 0.01$ ，\*\*\* $p < 0.001$ )

### 貳-5-5 anti-CEACAM6 抗體抑制 MCF-7 細胞中基質金屬蛋白酶的活性

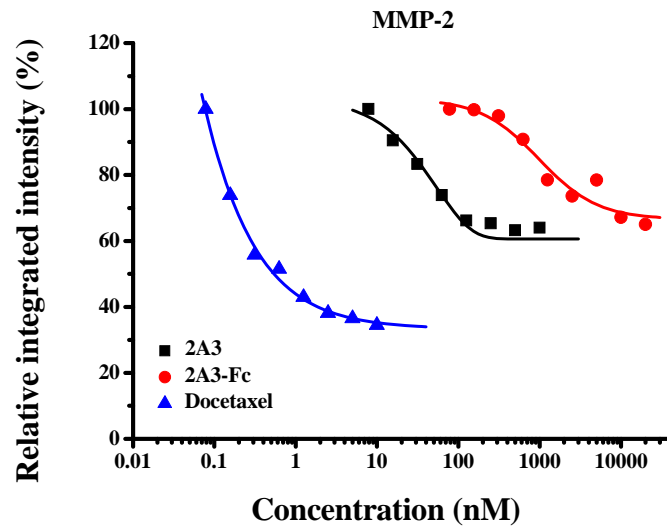
在癌細胞中，基質金屬蛋白酶的分泌可以使細胞基質被侵蝕，造成癌細胞可進一步侵犯周邊細胞基質而爬行至血管中，最後可能會大量增殖，又被誘導形成新生血管而提高癌細胞轉移之機率。故此以明膠電泳法分析由 anti-CEACAM6 抗體 sdAb 2A3 與 HCAb 2A3-Fc 處理 MCF-7 乳癌細胞 72 小時後，分別對於細胞內之基質金屬蛋白酶 (MMP-2、MMP-9) 活性是否造成影響。

由圖 43 中顯示，圖 43(A) 為明膠電泳之結果，而圖 43(B) 與圖 43(C) 則針對圖 43(A) 中之訊號作強度分析：乳癌細胞株 MCF-7 經由 anti-CEACAM6 抗體處理後，會抑制細胞內的基質金屬蛋白酶 2 (MMP-2) 及基質金屬蛋白酶 9 (MMP-9) 之活性，並且在圖 43(B) 可見 MMP-2 之活性可被 anti-CEACAM6 抗體 2A3、2A3-Fc 抑制將近 40%；而同樣也以歐洲紫杉醇做測試，則其於 1 nM 濃度以下即可抑制 MMP-2 之活性達 50% 以上。圖 43(C) 顯示 MMP-9 之活性分析結果，在 anti-CEACAM6 抗體處理下，相對於控制組之 MMP-9 活性，以濃度約 0.13  $\mu\text{M}$  之 sdAb 2A3 處理對於乳癌細胞內的 MMP-9 活性可抑制達 50% 以上，而 HCAb 2A3-Fc 也可抑制 MMP-9 活性至約 45%；再者，以約 1 nM 濃度之歐洲紫杉醇處理後，也看見其明顯抑制了 MMP-9 活性至 50%。

(A)



(B)



(C)

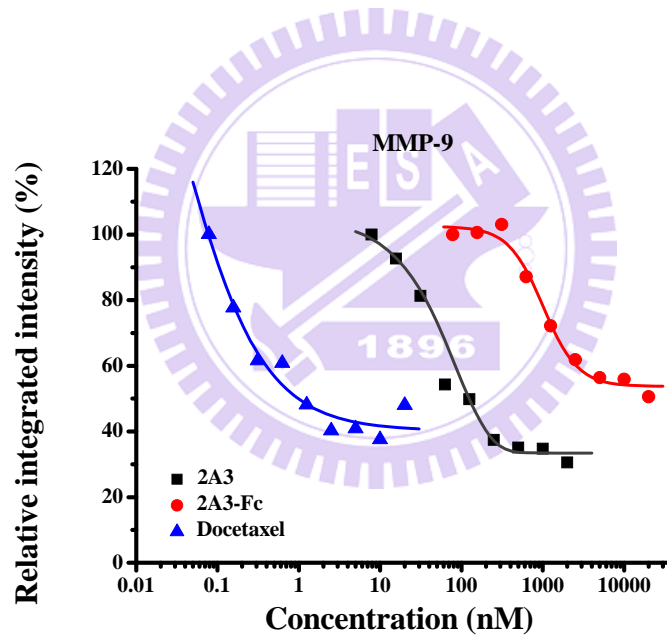


圖 43、sdAb 2A3 與 HCAb 2A3-Fc 抑制細胞內之 MMP-2 與 MMP-9 之活性分析

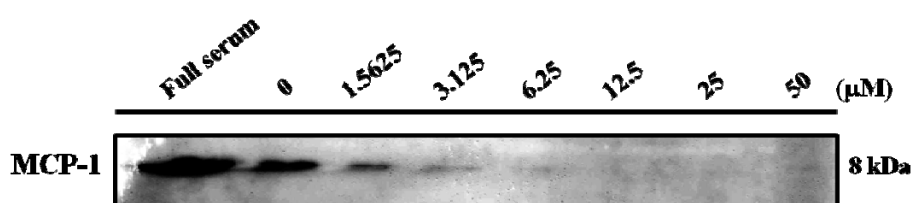
圖(A) 利用明膠蛋白酶電泳法，分析經由 anti-CEACAM6 抗體處理後細胞內 MMP-2 與 MMP-9 之活性，以  $5 \times 10^3$  cells/well MCF-7 細胞培養於 96 孔細胞培養盤 24 小時，第二天分別以以 2 倍序列稀釋 anti-CEACAM6 抗體以及歐洲紫杉醇並處理細胞 72 小時於 starvation medium，並以單純加有 starvation medium 之細胞為控制組，第五天收取細胞培養液並跑明膠蛋白酶電泳分析 MMP-2 與 MMP-9 之活性。其中，MMP-2 分子量約為 72 kDa，MMP-9 分子量約為 92 kDa。圖(B)與圖(C)係將圖(A)中明膠蛋白酶電泳之膠片做影像分析，計算其中 MMP-2 與 MMP-9 之強度，並以繪圖軟體擬合出其趨勢線(n 值=3)。

## 貳-5-6 anti-CEACAM6 抗體依濃度依賴性抑制單核球細胞趨化蛋白之表現

在乳癌中，單核球細胞浸潤於組織之情形相較於其他種類之癌症，其比例高出將近 30%，故於此實驗中欲了解經由 anti-CEACAM6 處理後，是否會降低單核球細胞趨化蛋白之表現。

將 anti-CEACAM6 抗體中之 HCAb 2A3-Fc 以兩倍序列稀釋為 0  $\mu\text{M}$ ~50  $\mu\text{M}$  以處理 MCF-7 細胞。經由 72 小時的作用與培養後，可見 MCF-7 細胞中之單核球細胞趨化蛋白 MCP-1 表現量有明顯被抑制之現象，並且呈現濃度依賴性 (dose-dependent) 隨著所處理濃度越高，細胞中單核球細胞趨化蛋白 MCP-1 之表達也因而下降，並且於處理 3.125 mM 時，MCP-1 之表現量只剩下控制組的 10% 左右(圖 44)。

(A)



(B)

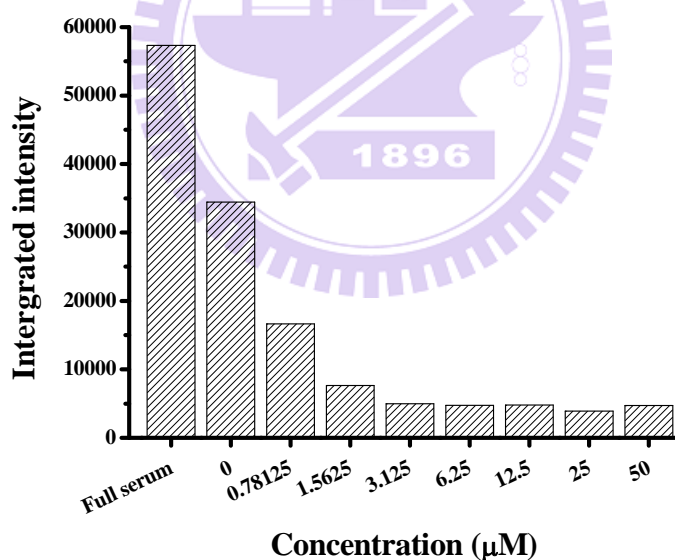


圖 44、HCAb 2A3-Fc 抑制細胞內 MCP-1 表現量之分析

以  $5 \times 10^3$  cells/well MCF-7 細胞培養於 96 孔細胞培養盤 24 小時，第二天分別以以 2 倍序列稀釋 HCAb 2A3-Fc 抗體並處理細胞 72 小時於 starvation medium，並以單純加含有正常 10% FBS 胎牛血清細胞培養液培養之細胞為控制組，第五天收取細胞培養液並以西方墨點法分析 MCP-1 蛋白質於 MCF-7 細胞中之表現量。其中，圖(A)為西方墨點法之實驗結果；而圖(B)則針對圖(A)中之 MCP-1 蛋白質強度定量分析，橫軸為 2A3-Fc 抗體處理濃度，縱軸表示相對強度。



## 貳-5-7 anti- CEACAM6 抗體與 anti-HER-2 抗體降低細胞黏附因子 ICAM-1 以及 VCAM-1 之表現

於癌細胞周邊，細胞間黏附因子 1 (ICAM-1)與血管細胞黏附因子 1 (VCAM-1)會作用於免疫單核細胞，免疫單核細胞被細胞黏附因子 ICAM-1 及 VCAM-1 結合後，會透過內皮細胞到組織間，而進一步與組織內之單核球細胞趨化蛋白 MCP-1 作用，使其大量浸潤至組織中。故於此，以 anti-HER-2 抗體與 anti-CEACAM6 抗體處理細胞後，觀察細胞培養液中細胞所分泌出之細胞間黏附因子 ICAM-1 與血管細胞黏附因子 VCAM-1 之蛋白質分泌量是否上升或下降，可進一步推測其對於免疫球細胞於乳癌細胞之浸潤作用的影響。

實驗中，於 MCF-7 乳癌細胞分別以 10  $\mu$ M 之 2A3、2A3-Fc、HER-2、HER-2-Fc 抗體以及 10 nM 之歐洲紫杉醇處理 72 小時，而後收取細胞培養液以西方墨點法分析細胞分泌出之細胞黏附因子 ICAM-1、VCAM-1 表現。

由圖 45 之結果顯示，以 10 nM 之歐洲紫杉醇處理者作為實驗控制組，其分別在 MCF-7 乳癌細胞中有些許正常表現；而在 anti- CEACAM6 抗體與 anti-HER-2 抗體之處理下，細胞間黏附因子 ICAM-1 與血管細胞黏附因子 VCAM-1 皆有明顯被抑制之情況，且幾乎不再分泌。

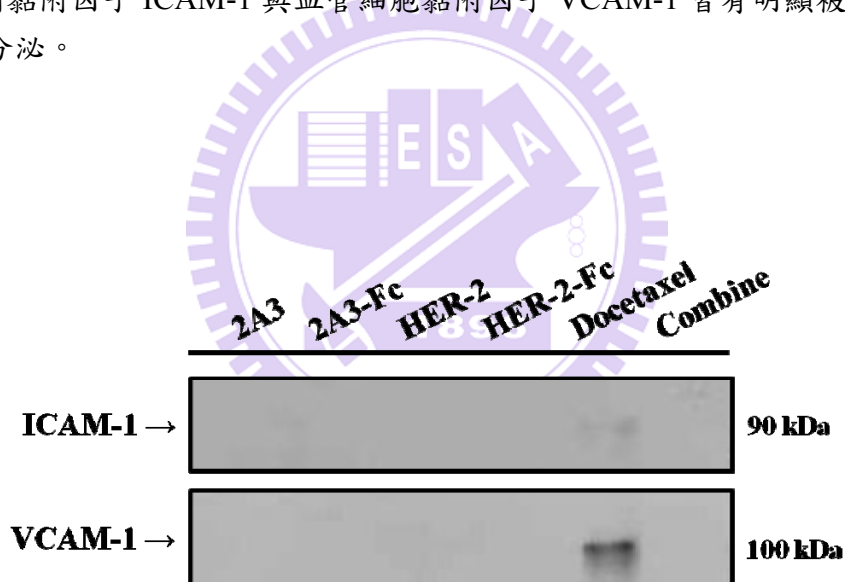


圖 45、sdAb 與 HCAb 處理 MCF-7 細胞後細胞分泌之細胞黏附因子表現量分析

以  $6 \times 10^5$  cells/well MCF-7 細胞培養於直徑 6 公分之細胞培養盤 24 小時，第二天於 starvation medium 中分別加入 10  $\mu$ M 之 2A3、2A3-Fc、HER-2、HER-2-Fc 抗體處理細胞 72 小時，並以 10 nM 之歐洲紫杉醇所處理之細胞為控制組，第五天收集細胞培養液並以西方墨點法分析 ICAM-1 及 VCAM-1 蛋白質於 MCF-7 細胞中之表現量。

## 貳-5-8 anti-CEACAM6 抗體與 anti-HER-2 抗體抑制免疫球細胞 THP-1 對乳癌細胞 MCF-7 的浸潤作用

此實驗細接續前兩個實驗，以直接觀察處理了 anti-CEACAM6 抗體與 anti-HER-2 抗體後，免疫球細胞 THP-1 對乳癌細胞 MCF-7 的浸潤作用是否有被抑制之作用。

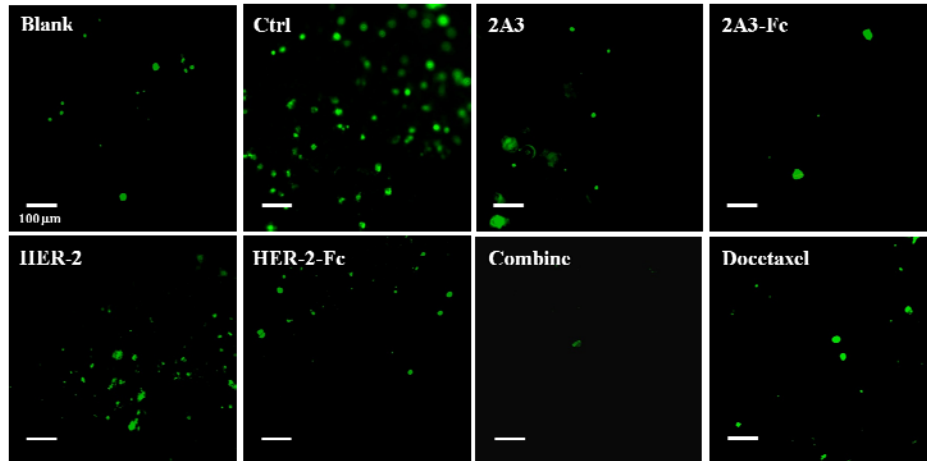
分別以 20  $\mu\text{M}$  之 anti-CEACAM6 抗體 2A3、2A3-Fc 及 10  $\mu\text{M}$  之 anti-HER-2 抗體 HER-2、HER-2-Fc 與 20 nM 之歐洲紫杉醇處理 MCF-7 乳癌細胞，24 小時後加入免疫球細胞 THP-1 於 8  $\mu\text{m}$  insert well 中培養 24 小時觀察 THP-1 細胞浸潤、穿過膜之能之能力。

由結果(圖 46)顯示，處理各種抗體與藥物後，THP-1 之浸潤情況確實有明顯抑制之情況。如貳-圖 16 所示，anti-CEACAM6 抗體 2A3 與 2A3-Fc 分別可使 THP-1 之浸潤情況下降至 39.6% 及 17.94%；anti-HER-2 抗體 HER-2 與 HER-2-Fc 分別可使 THP-1 之浸潤情況下降至 32.19% 及 18.5%；而在 2A3 與 HER-2 合併處理之實驗組中，其抑制免疫球細胞 THP-1 對乳癌細胞之浸潤效果高達 93.45%。而歐洲紫杉醇作為正向控制組，其對於 THP-1 之浸潤也有將近 65% 之抑制效果。

值得一提的是，在 HCAb 的部分，處理了 2A3-Fc 以及 HER-2-Fc 之實驗組與控制組比較，皆使得免疫球細胞 THP-1 之浸潤乳癌細胞 MCF-7 之作用下降到 20% 以下。與 sdAb 相比較，HCAb 在抑制免疫球細胞浸潤乳癌細胞之效應皆高出約 20% 左右。



(A)



(B)

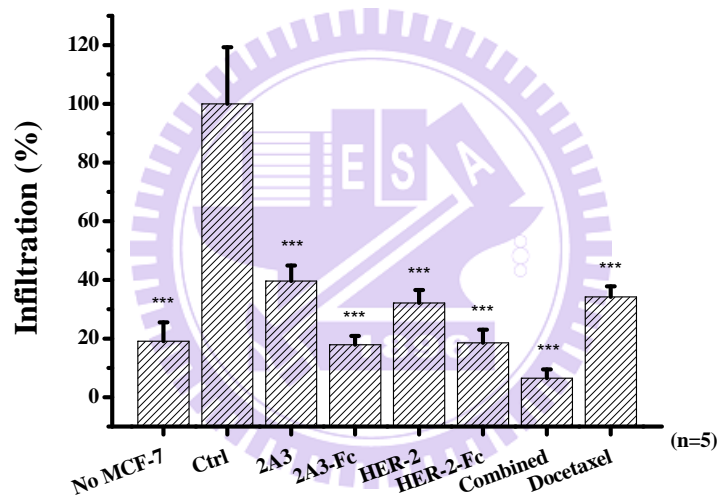


圖 46、分析經由 sdAb、HCAb 處理後，免疫球細胞 THP-1 對 MCF-7 之浸潤作用

培養  $2 \times 10^5$  cells/well MCF-7 於 24 孔細胞培養盤中 24 小時，後續分別將之處理 20  $\mu$ M 2A3 及 2A3-Fc、10  $\mu$ M HER-2 及 HER-2-Fc 抗體與 20 nM 歐洲紫杉醇 24 小時。第三天在 24 孔盤中置入孔徑為 8  $\mu$ m 之 insert well，並加入  $1 \times 10^5$  cells/ insert well THP-1 培養 24 小時，再於 insert well 中滴入 1  $\mu$ l/ml calcein AM 染劑，於 37°C incubator 中反應 30 分鐘，待活細胞吃進染劑後切下 insert well 下方 membrane 觀察。圖(A)中，綠色螢光為活細胞所噬入之 calcein AM 經由波長 488 nm 激發所得訊號。圖(A) Blank 為實驗空白對照組，24 孔盤內無種入 MCF-7 細胞，只於 insert well 中種入 THP-1；Control 為單純以 starvation medium 培養之實驗對照組；2A3 為處理 20  $\mu$ M sdAb 2A3 實驗組；2A3-Fc 為處理 20  $\mu$ M HCAb 2A3-Fc 實驗組；HER-2 為處理 20  $\mu$ M sdAb HER-2 實驗組；HER-2-Fc 為處理 20  $\mu$ M HCAb HER-2-Fc 實驗組；Combine 為為同時處理 20  $\mu$ M HCAb 2A3 與 HER-2-Fc 之實驗組；Docetaxel 為處理 20 nM 實驗組。圖(B)之橫軸表示各個實驗組，縱軸為 THP-1 浸潤 MCF-7 之比例。(n 值=5；\*\*\*p<0.001)

## 貳-5-9 anti-CEACAM6 抗體與 anti-HER-2 抗體抑制 MCF-7 的侵犯作用

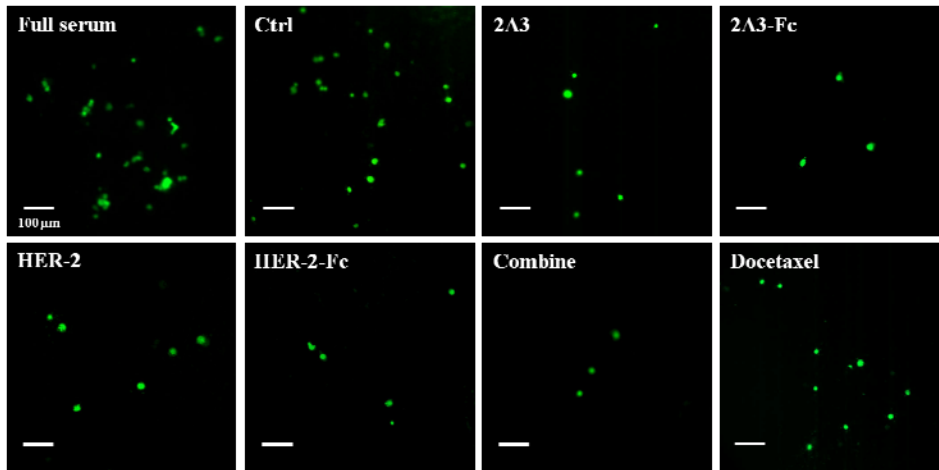
癌細胞所釋放出之基質金屬蛋白酶 MMP-2 及 MMP-9 會降解其周邊的細胞外基質 (ECM degradation)，此時，癌細胞藉著被降解處爬行，最後可能轉移至血管而進一步轉移到其他組織中。為此，以 anti-CEACAM6 抗體與 anti-HER-2 抗體處理乳癌細胞 MCF-7，觀察其對於 MCF-7 的侵犯作用是否具有抑制之效果。

分別以 10  $\mu$ M 之 sdAb 2A3、HER-2 及 HCAb 2A3-Fc、HER-2-Fc 與 10 nM 之歐洲紫杉醇處理 MCF-7 於 8  $\mu$ m insert well 中，24 小時後加入 1  $\mu$ l/ml calcein AM 培養 1 小時觀察乳癌細胞對於 matrigel 之侵蝕以及穿透至膜能力。

由結果顯示(圖 47)，處理 anti-CEACAM6 抗體與 anti-HER-2 抗體確實對於 MCF-7 癌症細胞之侵犯作用有明顯效果。在 sdAb 處理後，2A3 與 HER-2 抗體部分與控制組比對下，分別針對 MCF-7 乳癌細胞之侵犯作用可抑制至 26.8% 以及 22.1%。尤其在 HCAb 的部分，處理了 2A3-Fc 之實驗組可使 MCF-7 乳癌細胞之侵犯作用下降至 14.1%，HER-2-Fc 之作用也降至 15.4%，並且在同時以 2A3 及 HER-2 合併處理之實驗組與控制組相比對，其甚至使抑制了高達 90% 的癌細胞侵犯作用。另外，歐洲紫杉醇於此分析中也促使乳癌細胞侵犯的情況降為 66.2% 以下。



(A)



(B)

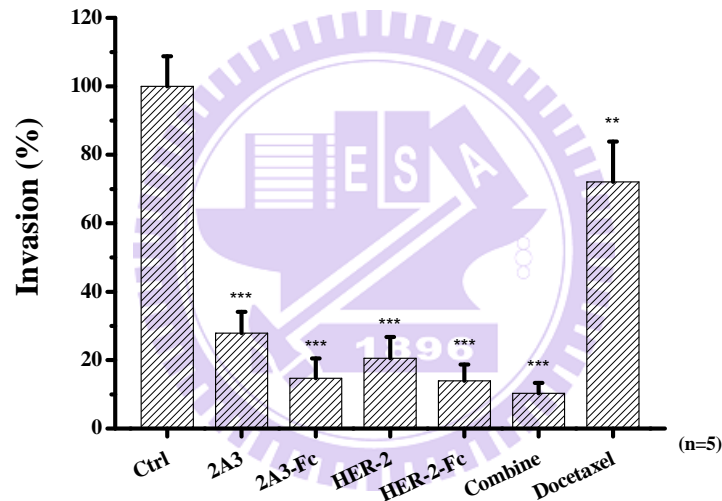


圖 47、分析經由 sdAb、HCAb 處理後，乳癌細胞 MCF-7 之侵犯作用

事先將 8 μm 鋪上 50 μl/well 之 matrigel。培養  $1 \times 10^5$  cells/well MCF-7 於 insert well 中，同時分別將之處理抗體與藥物 12~16 小時後，再於 insert well 中滴入 1 μl/ml calcein AM 染劑，於 37°C incubator 中反應 30 分鐘，待活細胞吃進染劑後移除 matrigel 並切下 insert well 下方之 membrane 觀察。圖(A)中，綠色螢光為活細胞所噬入之 calcein AM 經由波長 488 nm 激發所得訊號。圖(A) Full serum 為只以含有 10% 胎牛血清之細胞培養液培養之對照組；Ctrl 為單純以 starvation medium 培養之實驗控制組；2A3 為處理 10 μM sdAb 2A3 實驗組；2A3-Fc 為處理 10 μM HCAb 2A3-Fc 實驗組；HER-2 為處理 10 μM sdAb HER-2 實驗組；HER-2-Fc 為處理 10 μM HCAb HER-2-Fc 實驗組；Combine 為同時處理 10 μM sdAb 2A3 與 HER-2 之實驗組；Docetaxel 為處理 10 nM 之實驗組。圖(B)之橫軸表示各個實驗組，縱軸為 MCF-7 侵犯之比例。(n 值=5；\*\*p<0.01，\*\*\*p<0.001)



## 貳-5-10 anti-CEACAM6 抗體與 anti-HER-2 抗體降低 MCF-7 所誘發的 HUVECs 血管新生作用

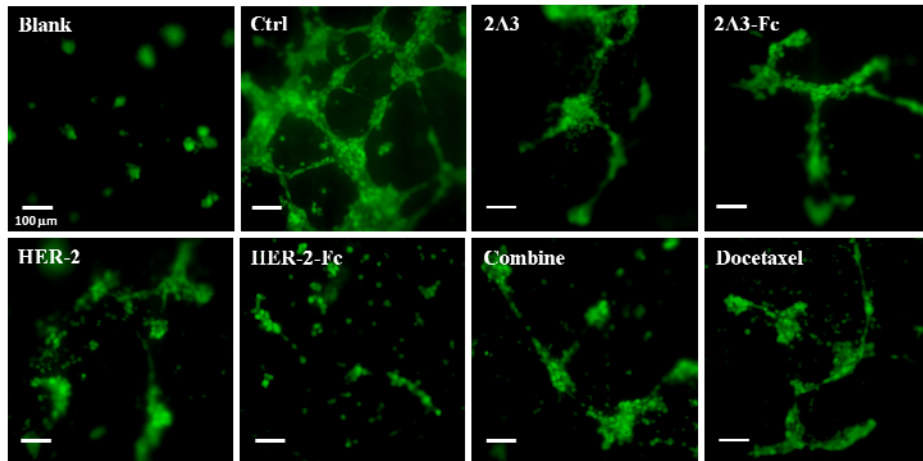
一般當腫瘤形成時，癌細胞或其周圍結締組織會分泌一些促進血管新生之物質 (angiogenic substances)，這些物質會誘導血管中內皮細胞的增生，且一直向分泌促進血管新生物質處生長，最後漸漸組合、形成新生之血管。而這些新生血管對於腫瘤之養分供給為重要來源，腫瘤長大皆依靠血管帶來之養分。故此部分將以 anti-CEACAM6 抗體與 anti-HER-2 抗體處理 MCF-7 乳癌細胞，取得其分泌於細胞培養液中之物質進一步處理臍靜脈內皮細胞 HUVECs，最後分析 anti-CEACAM6 抗體與 anti-HER-2 抗體對於內皮細胞造成血管新生之作用為何。

分別以 10  $\mu$ M 之 sdAb 2A3、HER-2 及 HCAb 2A3-Fc、HER-2-Fc 與 10 nM 之歐洲紫杉醇處理 MCF-7，24 小時後取 100  $\mu$ l 以處理了 MCF-7 後的細胞培養液於 8  $\mu$ m insert well 中培養上皮細胞 HUVECs，12~18 小時後加入 1  $\mu$ l/ml calcein AM 培養 1 小時觀察上皮細胞是否會受到 MCF-7 所釋放促血管新生相關因子之影響，進而使 ECM 降解、細胞增殖並形成血管。

由結果顯示(圖 48)，在 5% 胎牛血清培養下，MCF-7 乳癌細胞所分泌出的物質確實有促血管新生的作用，在顯微影像的觀察中，其新生血管比例極高且分枝點多；而不給與血清(即以 starvation medium 處理)之實驗組則不會形成任何的新生血管。

而在數據中也看出，MCF-7 乳癌細胞經由處理各種抗體與藥物後所分泌出之物質，對於上皮細胞 HUVECs 形成新生血管之作用確實具有明顯抑制之作用。於 anti-CEACAM6 抗體中，2A3 與 2A3-Fc 處理之實驗組其生長出的新生血管長度與控制組相比只有 28.24% 及 19.78%；經 anti-HER-2 抗體 HER-2 與 HER-2-Fc 處理後之實驗組所生長出的新生血管長度同樣與控制組作比較，可得其分別長出血管之比例只剩 22.38% 及 7.19%；合併處理了 2A3 與 HER-2 之實驗組則使新生血管之長度比例下降為 22.58%。而在歐洲紫杉醇的作用下，新生血管長度比例降為 34.66%。

(A)



(B)

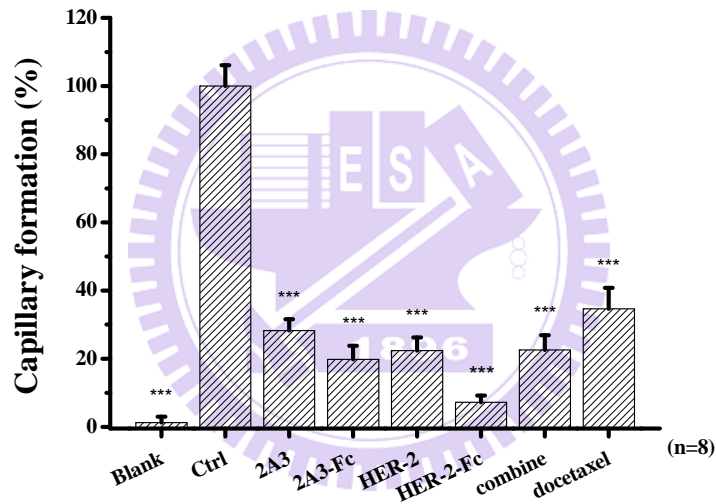


圖 48、分析經由 sdAb、HCAb 處理後，乳癌細胞 MCF-7 與周邊上皮細胞 HUVECs 之血管新生作用

事先將 8  $\mu\text{m}$  鋪上 50  $\mu\text{l/well}$  之 matrigel。培養  $1 \times 10^5$  cells/well MCF-7 於 insert well 中，同時分別將之處理抗體與藥物 12~16 小時後，再於 insert well 中滴入 1  $\mu\text{l/ml}$  calcein AM 染劑，於 37°C incubator 中反應 30 分鐘，待活細胞吃進染劑後移除 matrigel 並切下 insert well 下方 membrane 觀察。圖(A)中，綠色螢光為活細胞所噬入之 calcein AM 經由波長 488 nm 激發所得訊號。圖(A) Blank 為為單純以 starvation medium 培養之實驗對照組；Ctrl 為以正常條件下含有 10% 胎牛血清之細胞培養液培養之實驗對照組；2A3 為處理 10  $\mu\text{M}$  sdAb 2A3 實驗組；2A3-Fc 為處理 10  $\mu\text{M}$  HCAb 2A3-Fc 實驗組；HER-2 為處理 10  $\mu\text{M}$  sdAb HER-2 實驗組；HER-2-Fc 為處理 10  $\mu\text{M}$  HCAb HER-2-Fc 實驗組；Combine 為為同時處理 10  $\mu\text{M}$  HCAb 2A3 與 HER-2-Fc 之實驗組；Docetaxel 為處理 10 nM 實驗組。圖(B)之橫軸表示各個實驗組，縱軸為內皮細胞 HUVECs 形成血管總長之比例。(n 值=3；\*\*\*p<0.001)

### 貳-5-11 單一抗原結合功能區抗體誘導細胞凋亡相關蛋白之表現

由結果貳-5-4 中細胞死亡分析之結果得知，經 anti-CEACAM6 抗體與 anti-HER-2 抗體處理後，會造成 MCF-7 乳癌細胞走向細胞凋亡之細胞死亡路徑，故以西方墨點法檢測與細胞凋亡相關的蛋白質 caspase-9 與 PARP 之表現。

分別以 10  $\mu$ M 之 sdAb 2A3、HER-2 及 HCAb 2A3-Fc、HER-2-Fc 與 10 nM 之歐洲紫杉醇處理 MCF-7 乳癌細胞，反應 24 小時後抽取細胞內總蛋白質加以分析。依圖 49 之結果顯示，在含有 10% 胎牛血清或 starvation medium 培養之細胞中不會表現活化態之凋亡蛋白 caspase-9，並且此二組之全長(即不活化態)多核醣核酸聚合酶之正常表現於細胞中；而以 anti-CEACAM6 抗體 2A3、2A3-Fc 及 anti-HER-2 抗體 HER-2、HER-2-Fc 處理後之 MCF-7 乳癌細胞中，其活化態之凋亡蛋白 caspase-9 皆有被誘發的情形，且全長的多核醣核酸聚合酶已完全被切割並喪失修復去氧核醣核酸能力。於處理歐洲紫杉醇(為細胞凋亡正向調控之藥物)後的 MCF-7 乳癌細胞中，這些蛋白質之表現情況也相同於其他抗體處理之實驗組。

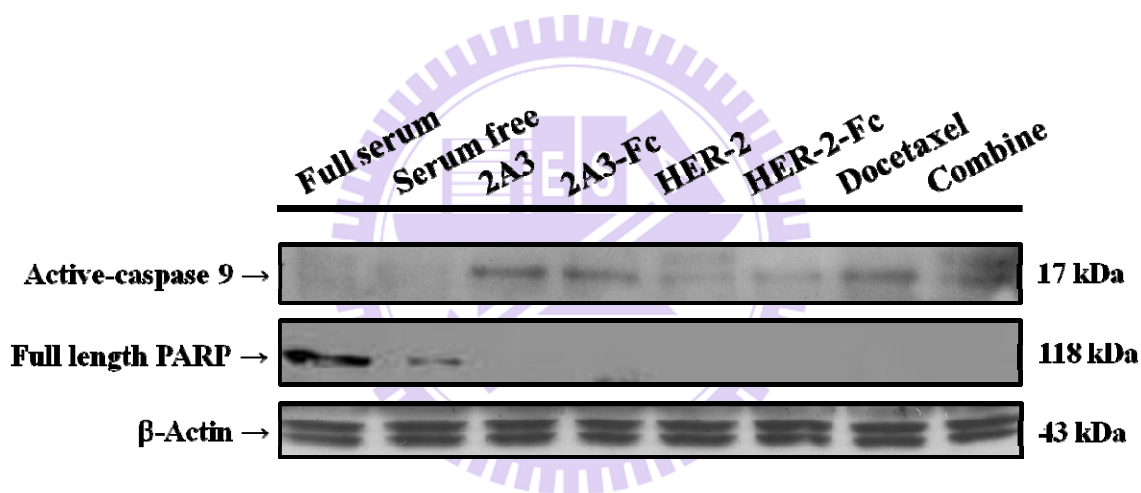


圖 49、sdAb 與 HCAb 處理 MCF-7 細胞後細胞內之細胞凋亡相關蛋白質表現量分析

以  $6 \times 10^5$  cells/well MCF-7 細胞培養於直徑 6 公分之細胞培養盤 24 小時，第二天於 starvation medium 中分別加入 10  $\mu$ M 之 2A3、2A3-Fc、HER-2、HER-2-Fc 抗體以及 10 nM 之歐洲紫杉醇處理細胞 72 小時，並以加入含有 10% FBS 胎牛血清細胞培養液培養之細胞為對照組，單純以 starvation medium 培養者為控制組。第五天收集細胞內總蛋白質並以西方墨點法分析 caspase-9 以及 PARP 蛋白質於 MCF-7 細胞中之表現量。圖中，Full serum 為以含有 10% 胎牛血清之細胞培養液培養之對照組；Serum free 為單純以 starvation medium 培養之實驗控制組；2A3 為處理 10  $\mu$ M sdAb 2A3 實驗組；2A3-Fc 為處理 10  $\mu$ M HCAb 2A3-Fc 實驗組；HER-2 為處理 10  $\mu$ M sdAb HER-2 實驗組；HER-2-Fc 為處理 10  $\mu$ M HCAb HER-2-Fc 實驗組；Docetaxel 為處理 10 nM 之實驗組；Combine 為同時處理 10  $\mu$ M sdAb 2A3 與 HER-2 之實驗組。Active-caspase-9 為活化態細胞凋亡蛋白 9，分子量約等於 17 kDa；Full length PARP 為全長之多核醣核酸聚合酶，分子量約等於 118 kDa； $\beta$ -Actin 為  $\beta$ -細胞骨架蛋白，分子量約等於 43kDa，做為此組實驗中之內部控制組 (internal control)。

## 貳、第六章 討論

### 貳-6-1 單一抗原結合功能區抗體之優點

在本研究中所使用之單一抗原結合功能區抗體取自南美洲駱馬 (llama)，具有高溶解度 (high solubility)、良好的熱穩定性 (thermal stability)、極佳的再折疊能力 (refolding capacity)、耐酸鹼能力佳 (pH4 ~ pH9)、結構穩定 (conformational stability)[293]等特性，且分子小，易於穿透組織[294]，只需短時間(數分鐘)即可到達標的位置。此外，可依需求接上不同胺基酸殘基(例如：-SH)擴展其應用性等優勢。

### 貳-6-2 單一抗原結合功能區抗體透過細胞凋亡路徑抑制乳癌細胞之增生

在癌症治療中，促癌細胞死亡的藥物大部分會傾向於使細胞走向細胞凋亡途徑[295]以避免對週遭細胞產生不良影響。但癌細胞本身屬於不正常增生之細胞，其去氧核糖核酸或去氧核糖核酸檢查及修復機制多有突變，致使癌細胞對抗癌藥物容易產生抗性。目前對於乳癌的治療研究中，乳癌細胞對於化療藥物產生抗性的途徑可能是經由活化 Akt 路徑[296]、大量表現 HOXB-7 蛋白以活化表皮生長因子受器路徑[297]等方式。換言之，傳統的化療藥物對於乳癌的治療，雖然有效，但是可能會因為癌細胞的抗藥性產生而使治療效果下降。

在本研究中，藉由針對乳癌細胞中特殊表現之 CEACAM6 以及 HER-2 單一抗原結合功能區抗體，處理 MCF-7 乳癌細胞後，以 Annexin V/PI 進行細胞雙染色，經由流式細胞儀分析其細胞死亡之情況發現癌細胞存活之比例大為下降，並且可由 Annexin V/PI 雙染色判別其死亡途徑為細胞凋亡途徑，且 anti-HER-2 之 HER-2 及 HER-2-Fc 抗體誘導細胞凋亡能力不亞於已知抗癌藥物-歐洲紫杉醇。在分子機制方面，因為 caspase 9 的活化，可以判斷細胞凋亡途徑可能是經由粒線體膜電位改變的內在凋亡途徑，最終的 PARP 蛋白質被降解，導致修復去氧核糖核酸能力喪失，證明了單一抗原結合功能區抗體所引起的細胞死亡是經由細胞凋亡路徑，並可經由此誘導細胞凋亡機制，使腫瘤本體之體積縮小，並抑制了腫瘤細胞的活性。

### 貳-6-3 單一抗原結合功能區抗體抑制乳癌細胞中基質金屬蛋白酶 MMP-2、MMP-9 活性

基質金屬蛋白酶家族在體內扮演降解細胞外基質的角色，包括：膠原蛋白 (collagen)、明膠 (gelatin)、纖維連接蛋白 (fibronectin)[298]。腫瘤的侵犯與血管新生不可或缺的因素為 neoplasias 與蛋白水解酶，增加蛋白質水解作用對降解細胞外基質具有加成之效應。而特別在基質金屬蛋白酶 2 和基質金屬蛋白酶 9 又被指出，其在腫瘤上皮細胞的過度表達將與腫瘤侵犯、血管新生以及腫瘤轉移相關[299, 300]，即是因為其二者對於降解細胞外基質有正向之反應[301]，其透過降解第四型膠原蛋白 (collagen IV)，使得癌細胞侵犯細胞外基質而造成癌細胞轉移[302]，並在一些研究中也證實其於乳癌中的高度表達[303-306]。

在結果貳-5-5 顯示，anti-CEACAM6 2A3 與 2A3-Fc 抗體分別能夠抑制 MMP-9 之活



性達 70 %及 50 %左右，而細胞內相對於 MMP-9 更穩定表現之 MMP-2(於細胞內為穩定表現且不易被影響之蛋白)在經由 anti-CEACAM6 2A3 與 2A3-Fc 抗體處理 MCF-7 乳癌細胞後，也能夠降低細胞內 MMP-2 之 40 %及 30 %的表達。因此，anti-CEACAM6 抗體對於抑制細胞外基質的降解具有相當的效果，能夠阻止細胞外基質被降解、細胞的爬行與腫瘤轉移至血管的情況。再來又可影響腫瘤進程後期，抑制上皮細胞之遷移及腫瘤周邊血管新生能力。

#### 貳-6-4 單一抗原結合功能區抗體抑制 THP-1 細胞浸潤乳癌細胞之作用

目前已有研究證實在乳癌的固態腫瘤組織中，有高達 80 %的組成為巨噬細胞 [307]。因此，研究單一抗原結合功能區抗體對於癌細胞浸潤作用即為一重要項目。

細胞內黏附因子 1 (ICAM-1)以及血管細胞黏附因子 1 (VCAM-1)主要負責調控細胞表面白細胞之黏附[308]。在癌細胞所分泌之細胞內黏附因子 1 與血管細胞黏附因子 1，可媒介癌細胞周邊血管中的白細胞與其吸引並貼附在一起，使得白細胞浸潤於腫瘤細胞中，導致原發腫瘤組織之壞死以及細胞的分離，增加腫瘤細胞轉移的機會。

於本研究中，對於乳癌所釋放出細胞內黏附因子 1、血管細胞黏附因子 1 進行分析。化療藥物-歐洲紫杉醇雖然有抑制巨噬細胞浸潤與乳癌細胞侵犯周邊之效果，但由於其會小量誘發細胞內黏附因子 1 及血管細胞黏附因子 1，造成的發炎反應將減緩藥物為癌細胞所帶來的療效，故相對的在細胞浸潤與侵犯分析中所看到之成效不如單一抗原結合功能區抗體來的好。而根據單一抗原結合功能區抗體之實驗結果發現，經由 anti-CEACAM6 抗體以及 anti-HER-2 抗體處理後之 MCF-7 乳癌細胞，其分泌細胞內黏附因子 1 與血管細胞黏附因子 1 之能力明顯被抗體作用所抑制，此結果代表在極少數或是沒有細胞內黏附因子 1 與血管細胞黏附因子 1 之狀況下，腫瘤周邊血管中的白細胞浸潤到乳癌細胞周邊細胞基質中的比例會大幅下降，無巨噬細胞(或極少)也代表了基質金屬蛋白酶 2 與基質金屬蛋白酶 9 被抑制，而進一步減低乳癌細胞之遷徙及轉移；並且不誘發腫瘤中發炎反應之發生能夠使單一抗原結合功能區抗體之處理效果更加顯著。

再者，另一個與巨噬細胞浸潤相關的重要蛋白-單核球細胞趨化蛋白 (MCP-1)，其與腫瘤細胞浸潤及腫瘤發展具有高度相關性。單核球細胞趨化蛋白為巨噬細胞、內皮細胞以及纖維細胞所分泌，此蛋白會趨化由細胞內黏附因子 1、血管細胞黏附因子 1 黏附並旋轉進入血管中的單核球演變成巨噬細胞。此時，巨噬細胞會再活化其他巨噬細胞的分化，使更多的單核球細胞趨化蛋白被分泌，造成腫瘤本體體積增長，以及擴散、轉移，並伴隨發炎反應使 MAPK 路徑啟動[309]。

因在基質金屬蛋白酶 MMP-2/-9 的活性分析中看到，anti-CEACAM-6 抗體處理後的 MCF-7 乳癌細胞，其所分泌之基質金屬蛋白酶 MMP-2/-9 會依劑量依存性下降，且效果最為明顯，故接以研究 anti-CEACAM-6 抗體對於單核球細胞趨化蛋白 MCP-1 之抑制作用。由結果貳-5-6，隨著 2A3-Fc 抗體處理 MCF-7 乳癌細胞的劑量愈高，其細胞所分泌之單核球細胞趨化蛋白 MCP-1 含量也被抑制降低。此現象可進一步解釋，2A3-Fc 抗體使得單核球細胞驅化為巨噬細胞且浸潤乳癌之機率下降，如此可使腫瘤細胞之生長停滯，且抑制其細胞遷徙、轉移。



## 貳-6-5 單一抗原結合功能區抗體抑制 MCF-7 乳癌細胞之侵犯與轉移

腫瘤細胞的侵犯作用源自於基質金屬蛋白酶的作用，基質金屬蛋白酶 MMP-2/-9 身為明膠酶之角色，會水解掉細胞外基質[310, 311]，使得腫瘤細胞延著細胞基質被降解處爬行至上皮，並且能穿越上皮細胞層轉移至血管中，利用血液的流動將腫瘤細胞帶到遠端新的組織，而後轉移發展出新的腫瘤體，並可因新生血管供給之養份擴大腫瘤體積[312]。而腫瘤細胞之侵犯與轉移為惡性腫瘤之特點，此二原因被視為是乳癌進程中病人死亡的參考因素[313]。

近期，由科學家 Poola 以及其共同研究者指出，癌胚抗原 6 於非典型腺管增生(atypical ductal hyperplasia, ADH)之侵犯性乳癌 (invasive breast cancer, IBC)的發展有關，於該研究中也證實在雌激素缺乏之乳腺癌細胞中，CEACAM6 為腫瘤細胞遷徙與侵犯的必要調控蛋白，且其也為腫瘤轉移之標的分子[314]。而其他研究中也提到，HER-2 蛋白質過度表達具有啟動腫瘤細胞侵犯作用之能力，且 HER-2 之訊息傳導路徑可誘導不同的轉移相關信號導致癌症轉移的機率增加；此外，HER-2 過度表現也證實係藉由此受體所媒介的抗細胞凋亡訊號使得產生治療之抗性[251]。故針對此些特點，若抑制了 CEACAM6 與 HER-2 之作用，則能夠同時阻斷腫瘤細胞的侵犯與轉移。

根據結果貳-5-9 所示，在歐洲紫杉醇處理的乳癌細胞中，其抑制癌細胞侵犯細胞基質的比例下降為約 70%，可能原因即為其可誘導小量之細胞內黏附因子 1、血管細胞黏附因子 1 的表達，使得產生發炎反應而降低藥物效用；而藉由 anti-CEACAM6 以及 anti-HER-2 之單一抗原結合功能區抗體來處理細胞內皆有大量表現 CEACAM6 及 HER-2 之 MCF-7 乳癌細胞，其對於癌細胞侵犯、穿透過細胞外基質之能力皆抑制了 70%-90% 的比例，相較於處理歐洲紫杉醇之實驗組足足高了三至六倍，顯示其對於阻斷腫瘤細胞的侵犯與轉移為一極具潛力之抗體藥物。

## 貳-6-6 單一抗原結合功能區抗體抑制乳癌之血管新生能力

癌變 (carcinogenesis) 為致癌基因 (oncogene) 與腫瘤抑制基因 (tumor suppressor gene) 經由多個步驟突變之結果。而血管新生又為影響腫瘤生長的一個重要過程，其決定了癌症進程後期，腫瘤組織增大與腫瘤細胞轉移與否。一般腫瘤體的生長若超出  $2\text{ mm}^3$ ，則在體內須要供給其額外之營養源方可使整個腫瘤組織繼續長大[315]。針對此實體腫瘤 (solid tumor) 之生長依賴於血管新生之假說源於 1971 年，由 Folkman 所提出[316]。

在一些化療藥物中，有些已被報導能夠針對上皮細胞之增生與遷移有抑制之效果，並阻斷新生血管之生成(neovascularization)，例如先前研究中指出，歐洲紫杉醇能夠依劑量依存特性抑制 HUVEC 細胞之增生，具有抑制血管新生的能力[317]，但其也被指出具有多重抗藥性的 Multidrug Resistance Protein 7 (MRP7) 蛋白會致使癌細胞對歐洲紫杉醇產生藥物抗性[318]。而乳癌之荷爾蒙療法目前使用之藥物例如 Herceptin 針對抑制乳癌腫瘤血管新生的能力有限，縱使與化療藥物 paclitaxel 合併處理亦同，並且其對於 HER-2 過度表現之乳癌具有抗性[319]。

因其在過去的研究中顯示，基質金屬蛋白酶 2、基質金屬蛋白酶 3 及基質金屬蛋白

酶 9 三者為媒介促使血管新生之蛋白(proangiogenic mediators)，且基質金屬蛋白酶 2 與基質金屬蛋白酶 9 表現不足之情況下會抑制腫瘤細胞侵犯與形成新生血管之能力 [320]。故在先前的結果中，已評估了基質金屬蛋白酶 2 與基質金屬蛋白酶 9 之活性，也得知 anti-CEACAM6 抗體能夠有效阻礙此二者的分泌。以下並進一步探討單一抗原結合功能區抗體對於血管新生之影響。

將單一抗原結合功能區抗體用於 MCF-7 乳癌細胞中，在 anti-CEACAM6 抗體處理下，2A3 與 2A3-Fc 能夠抑制 HUVEC 生成新生血管比例降低至 28.24% 及 19.78%；而在 anti-HER-2 抗體處理之結果，又較 anti-CEACAM6 抗體之反應更加顯著，HER-2 及 HER-2-Fc 分別可抑制將近 80% 及 93% 之 HUVEC 生成新生血管。此結果對照化學療法、荷爾蒙療法等對於阻礙癌症血管新生之能力相對傑出許多，尤其 HCAb 2A3-Fc 與 HER-2-Fc 幾乎終止癌症血管新生。且目前許多藥物對於 HER-2 過度表達之乳癌往往具有抗性，而此二種抗體皆不受癌細胞 HER-2 基因之抗性影響，可順利參與抑制血管新生的過程。

因大多數癌症的死亡起因於腫瘤細胞侵入到周圍組織使細胞進入血液循環，並且伴隨著腫瘤細胞之轉移與再擴大；一旦阻斷了腫瘤的血管新生，控制所有癌細胞之營養來源，即等於進一步抑制掉整個腫瘤的生長以及轉移，如此即可降低病人之死亡機率。

#### 貳-6-7 anti-HER-2 單一抗原結合功能區抗體與 Herceptin 於乳癌治療之差異

由於先前研究指出乳癌中有 25-30% 的病患其癌細胞中具有 Her-2/neu 基因之過度表現，而 Her-2/neu 基因呈陽性反應之乳癌患者則不適用荷爾蒙治療之方式，因此，化療藥物 Herceptin 在臨床試驗的成功與上市後即為 Her-2/neu 陽性患者的絕佳用藥，可延長此類病患的存活期。但同時也有研究指出，多數 Her-2/neu 陽性之乳癌病患對於僅單獨以 Herceptin 的治療並不具有良好效果，其可能因細胞內部的訊息調控造成癌細胞的抗藥機轉。

相對於大分子單株抗體藥物 Herceptin (分子量為 145 kDa)[321]，anti-Her-2 單一抗原結合功能區抗體因分子量較小，其在生物體內之擴散速度更快，此外，此抗體的結合能力 ( $10^{-9\sim 10}$ )，相對於 Herceptin 之結合能力 ( $10^{-8}$ ) 高出十幾倍[322]，anti-Her-2 單一抗原結合功能區抗體之鍵結能力高，即可以較低濃度作為處理劑量。

#### 貳-6-8 單一抗原結合功能區抗體之應用

先前單一抗原結合功能區抗體應用於癌症的研究，除了與表面抗原交互作用[323]，有一些研究是直接針對癌細胞內部分子作為調控，例如 Bax[324]、caspase-3[325]、tBid[326]、Etk 激酶[327]等。而本研究之設計則是針對乳癌細胞中特殊表現之 CEACAM6 以及 HER-2 蛋白作標靶，再進一步觀察單一抗原結合功能區抗體抑制細胞增生與造成細胞死亡之機制。

在可能的作用機制中，我們懷疑單一抗原結合功能區抗體係由抗體依賴性細胞毒性 (Antibody dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC) 之作用造成癌細胞的毒殺。抗體依賴性細胞毒性主要是巨噬細胞 (macrophage)、自然殺手細胞 (nature killer cell, NK

cell)、單核細胞 (monocyte)、中性細胞 (neutrophil)等有表達 IgG Fc 受體之細胞，會與靶細胞(病毒感染之細胞或腫瘤細胞等)表面所表現的 IgG Fc 辨識、結合，而自然殺手細胞又是 ADCC 主要作用之效應細胞，其被活化後會釋出一些活性物質，例如穿孔素 (perforin)、顆粒酶 (granzyme)等自然殺手細胞所有之攻擊武器，使得細胞被這些細胞毒素影響進而發生細胞凋亡。而本研究中，在單一抗原結合功能區抗體上接合了一段 IgG 之 Fc 片段，呼應流式細胞儀分析之結果，其經由細胞凋亡路徑使得乳癌細胞 MCF-7 死亡，即有可能為抗體依賴性細胞毒性作用之結果。

一般的抗癌藥物設計，主要可分為抑制血管新生 (Anti-angiogenesis)、抑制或殺死癌細胞、降低癌細胞轉移或侵犯能力等，在本研究中，我們所使用的單一抗原結合功能區抗體同時可以達到上述的目的，使其擁有更全面的治療效果。現有的抗癌藥物，如艾瑞莎 (Iressa)[328, 329]、癌思停 (Avastin)[330, 331]、紫杉醇 (Taxol)[332, 333]、小紅莓 (Doxorubicin)[334, 335]等，都是單一效果，如抑制訊息傳導或促進細胞凋亡等，當癌細胞產生抗性後，對於癌症治療效果即會劇烈下降。本研究所使用之單一抗原結合功能區抗體因其全面性治療效果，故可期為新一代癌症標靶治療藥物。



## 結論

根據每年關於癌症之統計數字顯示，在罹患癌症之總人口數當中，肺癌與乳癌皆為死亡率排名前三名之癌症，尤其肺癌與乳癌之罹病率長年居高不下，更對於社會資源與醫療資源造成極大的負擔。本研究特此針對這兩種癌症著手研究，融入奈米科學技術與生物學之概念作為設計特异性癌症標靶分子之基礎，對於肺癌大量表現的生長激素受體同時佐以奈米鑽石-生長激素受體結合蛋白複合體與高能脈衝雷射之處理，達到誘導肺腺癌細胞進行細胞凋亡而使得細胞增生之能力相對被抑制；而在特殊表現癌胚抗原相關黏著分子 6 以及高度表達人類表皮生長因子受體 2 的乳癌細胞，藉由單一抗原結合功能區抗體之治療，能夠全面性阻斷乳癌進程，包括抑制免疫細胞浸潤、腫瘤細胞增生、遷移、侵犯、轉移以及抑制血管新生、腫瘤體增大。

於此研究中發展出之標靶化奈米鑽石，具有低細胞毒性、高生物相容性、分子小且可經由熱聲子效應產生爆炸之種種特性，可加以設計與不同癌症之標的蛋白作接合並輔以雷射治療，此為高專一性、可調控、二階段式的光敏治療平台開發；而單一抗原結合功能區抗體則擁有高溶解度、良好的熱穩定性、極佳的抗酸鹼以及再折疊能力等特性，且對於乳癌細胞特定表現分子有高度專一性，並為低抗性產生之治療方式。此外，除了本研究中針對的 CEACAM6、HER-2 外，單一抗原結合功能區抗體也有潛力應用於其他有高度或過度表現特定分子的癌症，為癌症治療提供更佳的選擇與平台。



## 參考資料

1. 行政院衛生署, 2011.
2. Anand, P., A. Kunnumakara, C. Sundaram, K. Harikumar, S. Tharakan, O. Lai, B. Sung, and B. Aggarwal, *Cancer is a Preventable Disease that Requires Major Lifestyle Changes*. *Pharmaceutical Research*, 2008. 25: p. 2097-2116.
3. Sasco, A.J., M.B. Secretan, and K. Straif, *Tobacco smoking and cancer: a brief review of recent epidemiological evidence*. *Lung Cancer*, 2004. 45: p. S3-S9.
4. Daniel, D.C., *Highlight: BRCA1 and BRCA2 proteins in breast cancer*. *Microscopy Research and Technique*, 2002. 59: p. 68-83.
5. Xu, S. and Z. Weihua, *Loss of EGFR induced autophagy sensitizes hormone refractory prostate cancer cells to adriamycin*. *The Prostate*, 2011. 71: p. 1216-1224.
6. Lin, J., J. Manson, P. Kraft, B. Cochrane, M. Gunter, R. Chlebowski, and S. Zhang, *Estrogen and progesterone-related gene variants and colorectal cancer risk in women*. *BMC Medical Genetics*, 2011. 12: p. 78.
7. Marquez-Garban, D.C., V. Mah, M. Alavi, E.L. Maresh, H.-W. Chen, L. Bagryanova, S. Horvath, D. Chia, E. Garon, L. Goodglick, and R.J. Pietras, *Progesterone and estrogen receptor expression and activity in human non-small cell lung cancer*. *Steroids*, 2011. In Press, Corrected Proof.
8. Collins, K., T. Jacks, and N.P. Pavletich, *The cell cycle and cancer*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1997. 94: p. 2776-2778.
9. Massague, J., *G1 cell-cycle control and cancer*. *Nature*, 2004. 432: p. 298-306.
10. Hartwell, L.H. and M.B. Kastan, *Cell cycle control and cancer*. *Science*, 1994. 266: p. 1821-1828.
11. Schlange, T., Y. Matsuda, S. Lienhard, A. Huber, and N. Hynes, *Autocrine WNT signaling contributes to breast cancer cell proliferation via the canonical WNT pathway and EGFR transactivation*. *Breast Cancer Research*, 2007. 9: p. R63.
12. Petersen, S.L., L. Wang, A. Yalcin-Chin, L. Li, M. Peyton, J. Minna, P. Harran, and X. Wang, *Autocrine TNF[alpha] Signaling Renders Human Cancer Cells Susceptible to Smac-Mimetic-Induced Apoptosis*. *Cancer Cell*, 2007. 12: p. 445-456.
13. Dagvadorj, A., S. Collins, J.-B. Jomain, J. Abdulghani, J. Karras, T. Zellweger, H. Li, M. Nurmi, K. Alanen, T. Mirtti, T. Visakorpi, L. Bubendorf, V. Goffin, and M.T. Nevalainen, *Autocrine Prolactin Promotes Prostate Cancer Cell Growth via Janus Kinase-2-Signal Transducer and Activator of Transcription-5a/b Signaling Pathway*. *Endocrinology*, 2007. 148: p. 3089-3101.
14. Hoshino, Y., Y. Katsuno, S. Ehata, and K. Miyazono, *Autocrine TGF-beta protects*



- breast cancer cells from apoptosis through reduction of BH3-only protein, Bim.* Journal of Biochemistry, 2011. 149: p. 55-65.
15. Sethi, T., R.C. Rintoul, S.M. Moore, A.C. MacKinnon, D. Salter, C. Choo, E.R. Chilvers, I. Dransfield, S.C. Donnelly, R. Strieter, and C. Haslett, *Extracellular matrix proteins protect small cell lung cancer cells against apoptosis: A mechanism for small cell lung cancer growth and drug resistance in vivo.* Nat Med, 1999. 5: p. 662-668.
  16. Li, P., H. Lee, S. Guo, T.G. Unterman, G. Jenster, and W. Bai, *AKT-Independent Protection of Prostate Cancer Cells from Apoptosis Mediated through Complex Formation between the Androgen Receptor and FKHR.* Mol. Cell. Biol., 2003. 23: p. 104-118.
  17. Schrader, J., O. Deuster, B. Rinn, M. Schulz, A. Kautz, R. Dodel, B. Meyer, Y. Al-Abed, K. Balakrishnan, J. Reese, and M. Bacher, *Restoration of contact inhibition in human glioblastoma cell lines after MIF knockdown.* BMC Cancer, 2009. 9: p. 464.
  18. Zeng, Q. and W. Hong, *The Emerging Role of the Hippo Pathway in Cell Contact Inhibition, Organ Size Control, and Cancer Development in Mammals.* Cancer Cell, 2008. 13: p. 188-192.
  19. Liu, Y. and D.C. Dean, *Tumor initiation via loss of cell contact inhibition versus Ras mutation: Do all roads lead to EMT?* Cell Cycle, 2010. 9: p. 897-900.
  20. Sonoshita, M., M. Aoki, H. Fuwa, K. Aoki, H. Hosogi, Y. Sakai, H. Hashida, A. Takabayashi, M. Sasaki, S. Robine, K. Itoh, K. Yoshioka, F. Kakizaki, T. Kitamura, M. Oshima, and M.M. Taketo, *Suppression of Colon Cancer Metastasis by Aes through Inhibition of Notch Signaling.* Cancer Cell, 2011. 19: p. 125-137.
  21. DeNardo, D.G., J.B. Barreto, P. Andreu, L. Vasquez, D. Tawfik, N. Kolhatkar, and L.M. Coussens, *CD4+ T Cells Regulate Pulmonary Metastasis of Mammary Carcinomas by Enhancing Protumor Properties of Macrophages.* Cancer Cell, 2009. 16: p. 91-102.
  22. Wang, B., Y. Xiao, B.-B. Ding, N. Zhang, X.-b. Yuan, L. Gui, K.-X. Qian, S. Duan, Z. Chen, Y. Rao, and J.-G. Geng, *Induction of tumor angiogenesis by Slit-Robo signaling and inhibition of cancer growth by blocking Robo activity.* Cancer Cell, 2003. 4: p. 19-29.
  23. Oliner, J., H. Min, J. Leal, D. Yu, S. Rao, E. You, X. Tang, H. Kim, S. Meyer, S.J. Han, N. Hawkins, R. Rosenfeld, E. Davy, K. Graham, F. Jacobsen, S. Stevenson, J. Ho, Q. Chen, T. Hartmann, M. Michaels, M. Kelley, L. Li, K. Sitney, F. Martin, J.-R. Sun, N. Zhang, J. Lu, J. Estrada, R. Kumar, A. Coxon, S. Kaufman, J. Pretorius, S. Scully, R. Cattley, M. Payton, S. Coats, L. Nguyen, B. Desilva, A. Ndifor, I. Hayward, R. Radinsky, T. Boone, and R. Kendall, *Suppression of angiogenesis and tumor growth by selective inhibition of angiopoietin-2.* Cancer Cell, 2004. 6: p. 507-516.
  24. Eyler, C.E. and J.N. Rich, *Survival of the Fittest: Cancer Stem Cells in Therapeutic Resistance and Angiogenesis.* Journal of Clinical Oncology, 2008. 26: p. 2839-2845.
  25. Bani, M.R., K. Beckmann, J. Engel, M.P. Lux, C. Rauh, I. Eder, H.A. Bani, C. Breuel, A. Bach, M.W. Beckmann, and P.A. Fasching, *Correlates of the desire for improved*

- cosmetic results after breast-conserving therapy and mastectomy in breast cancer patients.* *The Breast*, 2008. 17: p. 640-645.
26. Nesvold, I.-L., A.A. Dahl, E. L. 繪 kkevik, A. Marit Mengshoel, and S.D. Foss 疇, *Arm and shoulder morbidity in breast cancer patients after breast-conserving therapy versus mastectomy.* *Acta Oncologica*, 2008. 47: p. 835-842.
  27. Barqawi, A.B. and E.D. Crawford, *The Current Use and Future Trends of Focal Surgical Therapy in the Management of Localized Prostate Cancer.* *The Cancer Journal*, 2007. 13: p. 313-317 10.1097/PPO.0b013e318156eb99.
  28. *Effects of Radiotherapy and Surgery in Early Breast Cancer ??An Overview of the Randomized Trials.* *New England Journal of Medicine*, 1995. 333: p. 1444-1456.
  29. Clarke M, Collins R, Darby S, Davies C, Elphinstone P, Evans E, Godwin J, Gray R, Hicks C, James S, MacKinnon E, McGale P, McHugh T, Peto R, Taylor C, and W. Y., *Effects of radiotherapy and of differences in the extent of surgery for early breast cancer on local recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials.* *The Lancet*, 2005. 366: p. 2087-2106.
  30. Maluccio, M., L.H. Einhorn, and R.J. Goulet, *Surgical therapy for testicular cancer metastatic to the liver.* *HPB*, 2007. 9: p. 199-200.
  31. Patel, A.R. and A.J. Stephenson, *Radiation therapy for prostate cancer after prostatectomy: adjuvant or salvage?* *Nat Rev Urol*, 2011. advance online publication.
  32. Whelan, T.J., J.-P. Pignol, M.N. Levine, J.A. Julian, R. MacKenzie, S. Parpia, W. Shelley, L. Grimard, J. Bowen, H. Lukka, F. Perera, A. Fyles, K. Schneider, S. Gulavita, and C. Freeman, *Long-Term Results of Hypofractionated Radiation Therapy for Breast Cancer.* *New England Journal of Medicine*, 2010. 362: p. 513-520.
  33. Boukaram, C. and J.-M. Hannoun-Levi, *Management of prostate cancer recurrence after definitive radiation therapy.* *Cancer Treatment Reviews*, 2010. 36: p. 91-100.
  34. Waddell, T.S. and D. Cunningham, *Chemotherapy: Perioperative therapy improves gastroesophageal cancer survival.* *Nat Rev Clin Oncol*, 2011. advance online publication.
  35. Chaudhry, P. and E. Asselin, *Resistance to chemotherapy and hormone therapy in endometrial cancer.* *Endocrine-Related Cancer*, 2009. 16: p. 363-380.
  36. Herrstedt, J. and P. Dombernowsky, *Anti-Emetic Therapy in Cancer Chemotherapy: Current Status.* *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 2007. 101: p. 143-150.
  37. Groves-Kirkby, N., *Prostate cancer: Immunotherapy and combined chemotherapy for castration-resistant and metastatic disease.* *Nat Rev Urol*, 2011. 7: p. 472-472.
  38. Sheng, W.-Y. and L. Huang, *Cancer Immunotherapy and Nanomedicine.* *Pharmaceutical Research*, 2011. 28: p. 200-214.
  39. Yasumoto, K., T. Hanagiri, and M. Takenoyama, *Lung cancer-associated tumor*

- antigens and the present status of immunotherapy against non-small-cell lung cancer. General Thoracic and Cardiovascular Surgery, 2009. 57: p. 449-457.*
40. Liu, J.-P., W. Chen, A.P. Schwarzer, and H. Li, *Telomerase in cancer immunotherapy. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer, 2009. 1805: p. 35-42.*
  41. Geller, M.A., S. Cooley, P.L. Judson, R. Ghebre, L.F. Carson, P.A. Argenta, A.L. Jonson, A. Panoskaltsis-Mortari, J. Curtsinger, D. McKenna, K. Dusenbery, R. Bliss, L.S. Downs, and J.S. Miller, *A phase II study of allogeneic natural killer cell therapy to treat patients with recurrent ovarian and breast cancer. Cytotherapy, 2011. 13: p. 98-107.*
  42. Iliopoulou, E., P. Kountourakis, M. Karamouzis, D. Doufexis, A. Ardavanis, C. Baxevanis, G. Rigatos, M. Papamichail, and S. Perez, *A phase I trial of adoptive transfer of allogeneic natural killer cells in patients with advanced non-small cell lung cancer. Cancer Immunology, Immunotherapy, 2010. 59: p. 1781-1789.*
  43. Zhao, B. and Y.-Y. He, *Recent advances in the prevention and treatment of skin cancer using photodynamic therapy. Expert Review of Anticancer Therapy, 2010. 10: p. 1797-1809.*
  44. Swartling, J., J. Axelsson, G. Ahlgren, K.M. Kalkner, S. Nilsson, S. Svanberg, K. Svanberg, and S. Andersson-Engels, *System for interstitial photodynamic therapy with online dosimetry: first clinical experiences of prostate cancer. Journal of Biomedical Optics, 2010. 15: p. 058003-9.*
  45. Segura, S., S. Puig, C. Carrera, M. Lecha, V. Borges, and J. Malvehy, *Non-invasive management of non-melanoma skin cancer in patients with cancer predisposition genodermatosis: a role for confocal microscopy and photodynamic therapy. Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology, 2011. 25: p. 819-827.*
  46. van Leenders, G.J.L.H., J.L. Boormans, C.J. Vissers, A.M. Hoogland, A.A. Bressers, B. Furusato, and J. Trapman, *Antibody EPR3864 is specific for ERG genomic fusions in prostate cancer: implications for pathological practice. Mod Pathol, 2011.*
  47. Lopus, M., *Antibody-DMI conjugates as cancer therapeutics. Cancer Letters, 2011. 307: p. 113-118.*
  48. Hisatsune, A., H. Nakayama, M. Kawasaki, I. Horie, T. Miyata, Y. Isohama, K.C. Kim, and H. Katsuki, *Anti-MUC1 antibody inhibits EGF receptor signaling in cancer cells. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2011. 405: p. 377-381.*
  49. Bevis, K.S., L.R. McNally, J.C. Sellers, D. Della Manna, A. Londono Joshi, H. Amm, J.M. Straughn Jr, and D.J. Buchsbaum, *Anti-tumor activity of an anti-DR5 monoclonal antibody, TRA-8, in combination with taxane/platinum-based chemotherapy in an ovarian cancer model. Gynecologic Oncology, 2011. 121: p. 193-199.*
  50. Wang, L., H. Chen, F. Liu, M.C. Madigan, C.A. Power, J. Hao, K.I. Patterson, M.H. Pourgholami, P.M. O'Brien, A.C. Perkins, and Y. Li, *Monoclonal antibody targeting MUC1 and increasing sensitivity to docetaxel as a novel strategy in treating human epithelial ovarian cancer. Cancer Letters, 2011. 300: p. 122-133.*

51. Satelli, A. and S. Li, *Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy*. Cellular and Molecular Life Sciences, 2011: p. 1-14.
52. Shultz, J.C. and C.E. Chalfant, *Caspase 9b: a new target for therapy in non-small-cell lung cancer*. Expert Review of Anticancer Therapy, 2011. 11: p. 499-502.
53. Gires, O. and P.A. Bauerle, *EpCAM As a Target in Cancer Therapy*. Journal of Clinical Oncology, 2010. 28: p. e239-e240.
54. Tagliabue, E., A. Balsari, M. Campiglio, and S.M. Pupa, *HER2 as a target for breast cancer therapy*. Expert Opinion on Biological Therapy, 2010. 10: p. 711-724.
55. Mitsudomi, T., *Advances in Target Therapy for Lung Cancer*. Japanese Journal of Clinical Oncology, 2010. 40: p. 101-106.
56. Kelly, R.J. and J.C. Morris, *Transforming growth factor-beta: A target for cancer therapy*. Journal of Immunotoxicology, 2010. 7: p. 15-26.
57. Ryan, B.M., N. O'Donovan, and M.J. Duffy, *Survivin: A new target for anti-cancer therapy*. Cancer Treatment Reviews, 2009. 35: p. 553-562.
58. Weinrauch, Y. and A. Zychlinsky, *THE INDUCTION OF APOPTOSIS BY BACTERIAL PATHOGENS*. Annual Review of Microbiology, 1999. 53: p. 155-187.
59. Gao, L.-Y. and Y. Abu Kwaik, *Hijacking of apoptotic pathways by bacterial pathogens*. Microbes and Infection, 2000. 2: p. 1705-1719.
60. Grasl-Kraupp, B., B. Ruttkay-Nedecky, H. Koudelka, K. Bukowska, W. Bursch, and R. Schulte-Hermann, *In situ detection of fragmented DNA (tunel assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis, and autolytic cell death: A cautionary note*. Hepatology, 1995. 21: p. 1465-1468.
61. Lockshin, R.A. and C.M. Williams, *Programmed cell death--I. Cytology of degeneration in the intersegmental muscles of the Pernyi silkworm*. Journal of Insect Physiology, 1965. 11: p. 123-126, IN1-IN5, 127-133.
62. Lockshin, R.A. and Z. Zakeri, *Programmed cell death and apoptosis: origins of the theory*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001. 2: p. 545-550.
63. Farber, E., *Programmed cell death: necrosis versus apoptosis*. Modern Pathology, 1994. 7: p. 605-609.
64. Kanduc D, Mittelman A, Serpico R, Sinigaglia E, Sinha AA, Natale C, Santacroce R, Di Corcia MG, Lucchese A, Dini L, Pani P, Santacroce S, Simone S, Bucci R, and F. E., *Cell death: apoptosis versus necrosis (review)*. International Journal of Oncology, 2002. 21: p. 165-170.
65. Levin, S., *Apoptosis, Necrosis, or Oncosis: What Is Your Diagnosis? A Report from the Cell Death Nomenclature Committee of the Society of Toxicologic Pathologists*. Toxicological Sciences, 1998. 41: p. 155-156.
66. Levin, S., T.J. Bucci, S.M. Cohen, A.S. Fix, J.F. Hardisty, E.K. Legrand, R.R.



- Maronpot, and B.F. Trump, *The Nomenclature of Cell Death: Recommendations of an ad hoc Committee of the Society of Toxicologic Pathologists*. Toxicologic Pathology, 1999. 27: p. 484-490.
67. Fehsel, K., V. Kolb-Bachofen, and K.-D. Kroncke, *Necrosis Is the Predominant Type of Islet Cell Death During Development of Insulin-Dependent Diabetes Mellitus in BB Rats*. Lab Invest, 2003. 83: p. 549-559.
  68. Kerr, J.F.R., *Neglected opportunities in apoptosis research*. Trends in Cell Biology, 1995. 5: p. 55-57.
  69. Kristian, T. and B.K. Siesjo, *Calcium in Ischemic Cell Death*. Stroke, 1998. 29: p. 705-718.
  70. Syntichaki, P., K. Xu, M. Driscoll, and N. Tavernarakis, *Specific aspartyl and calpain proteases are required for neurodegeneration in C. elegans*. Nature, 2002. 419: p. 939-944.
  71. Kohli, V., J.F. Madden, R.C. Bentley, and P.-A. Clavien, *Calpain mediates ischemic injury of the liver through modulation of apoptosis and necrosis*. Gastroenterology, 1999. 116: p. 168-178.
  72. Jaattela, M. and J. Tschopp, *Caspase-independent cell death in T lymphocytes*. Nat Immunol, 2003. 4: p. 416-423.
  73. Edinger, A.L. and C.B. Thompson, *Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy*. Current Opinion in Cell Biology, 2004. 16: p. 663-669.
  74. Claudio A Hetz, Vicente Torres, and A.F.G. Quest, *Beyond apoptosis: nonapoptotic cell death in physiology and disease*. Biochemistry and Cell Biology, 2005. 83: p. 579-588.
  75. Golstein, P. and G. Kroemer, *Cell death by necrosis: towards a molecular definition*. Trends in Biochemical Sciences, 2007. 32: p. 37-43.
  76. Leist, M. and M. Jäätelä, *Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001. 2: p. 589-598.
  77. Degenhardt, K., R. Mathew, B. Beaudoin, K. Bray, D. Anderson, G. Chen, C. Mukherjee, Y. Shi, C. G 瞻 inas, Y. Fan, D.A. Nelson, S. Jin, and E. White, *Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis*. Cancer Cell, 2006. 10: p. 51-64.
  78. Golstein, P. and G. Kroemer, *Redundant cell death mechanisms as relics and backups*. Cell Death Differ, 2005. 12: p. 1490-1496.
  79. Obeid, M., A. Tesniere, F. Ghiringhelli, G.M. Fimia, L. Apetoh, J.-L. Perfettini, M. Castedo, G. Mignot, T. Panaretakis, N. Casares, D. Metivier, N. Larochette, P. van Endert, F. Ciccocanti, M. Piacentini, L. Zitvogel, and G. Kroemer, *Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death*. Nat Med, 2007. 13: p. 54-61.



80. Hetz, C.A., M. Hunn, P. Rojas, V. Torres, L. Leyton, and A.F.G. Quest, *Caspase-dependent initiation of apoptosis and necrosis by the Fas receptor in lymphoid cells: onset of necrosis is associated with delayed ceramide increase*. *Journal of Cell Science*, 2002. 115: p. 4671-4683.
81. Peter, M.E. and P.H. Krammer, *The CD95(APO-1//Fas) DISC and beyond*. *Cell Death Differ*, 2003. 10: p. 26-35.
82. Grooten, J., V. Goossens, B. Vanhaesebroeck, and W. Fiers, *Cell membrane permeabilization and cellular collapse, followed by loss of dehydrogenase activity: Early events in tumour necrosis factor-induced cytotoxicity*. *Cytokine*, 1993. 5: p. 546-555.
83. Vercammen, D., P. Vandenabeele, R. Beyaert, W. Declercq, and W. Fiers, *Tumour necrosis factor-induced necrosis versus anti-Fas-induced apoptosis in L929 cells*. *Cytokine*, 1997. 9: p. 801-808.
84. Vercammen, D., R. Beyaert, G. Denecker, V. Goossens, G. Van Loo, W. Declercq, J. Grooten, W. Fiers, and P. Vandenabeele, *Inhibition of Caspases Increases the Sensitivity of L929 Cells to Necrosis Mediated by Tumor Necrosis Factor*. *The Journal of Experimental Medicine*, 1998. 187: p. 1477-1485.
85. Lin, Y., S. Choksi, H.-M. Shen, Q.-F. Yang, G.M. Hur, Y.S. Kim, J.H. Tran, S.A. Nedospasov, and Z.-g. Liu, *Tumor Necrosis Factor-induced Nonapoptotic Cell Death Requires Receptor-interacting Protein-mediated Cellular Reactive Oxygen Species Accumulation*. *Journal of Biological Chemistry*, 2004. 279: p. 10822-10828.
86. Lawrence, C.P. and S.C. Chow, *FADD deficiency sensitises Jurkat T cells to TNF-[alpha]-dependent necrosis during activation-induced cell death*. *FEBS Letters*, 2005. 579: p. 6465-6472.
87. Berghe, T.V., G. van Loo, X. Saelens, M. van Gurp, G. Brouckaert, M. Kalai, W. Declercq, and P. Vandenabeele, *Differential Signaling to Apoptotic and Necrotic Cell Death by Fas-associated Death Domain Protein FADD*. *Journal of Biological Chemistry*, 2004. 279: p. 7925-7933.
88. Schneider-Brachert, W., V. Tchikov, J. Neumeyer, M. Jakob, S. Winoto-Morbach, J. Held-Feindt, M. Heinrich, O. Merkel, M. Ehrenschwender, D. Adam, R. Mentlein, D. Kabelitz, and S. Schütze, *Compartmentalization of TNF Receptor 1 Signaling: Internalized TNF Receptosomes as Death Signaling Vesicles*. *Immunity*, 2004. 21: p. 415-428.
89. Micheau, O. and J.g. Tschopp, *Induction of TNF Receptor I-Mediated Apoptosis via Two Sequential Signaling Complexes*. *Cell*, 2003. 114: p. 181-190.
90. Harper, N., M. Hughes, M. MacFarlane, and G.M. Cohen, *Fas-associated Death Domain Protein and Caspase-8 Are Not Recruited to the Tumor Necrosis Factor Receptor 1 Signaling Complex during Tumor Necrosis Factor-induced Apoptosis*. *Journal of Biological Chemistry*, 2003. 278: p. 25534-25541.
91. Lee, T.H., Q. Huang, S. Oikemus, J. Shank, J.-J. Ventura, N. Cusson, R.R. Vaillancourt,

- B. Su, R.J. Davis, and M.A. Kelliher, *The Death Domain Kinase RIP1 Is Essential for Tumor Necrosis Factor Alpha Signaling to p38 Mitogen-Activated Protein Kinase*. Mol. Cell. Biol., 2003. 23: p. 8377-8385.
92. Devin, A., A. Cook, Y. Lin, Y. Rodriguez, M. Kelliher, and Z.G. Liu, *The distinct roles of TRAF2 and RIP in IKK activation by TNF-R1: TRAF2 recruits IKK to TNF-R1 while RIP mediates IKK activation*. Immunity, 2000. 12: p. 419-429.
93. Vanden Berghe, T., M. Kalai, G. Denecker, A. Meeus, X. Saelens, and P. Vandenabeele, *Necrosis is associated with IL-6 production but apoptosis is not*. Cellular Signalling, 2006. 18: p. 328-335.
94. Dirks, A.J. and C. Leeuwenburgh, *Tumor necrosis factor [alpha] signaling in skeletal muscle: effects of age and caloric restriction*. The Journal of Nutritional Biochemistry, 2006. 17: p. 501-508.
95. Schutze, S., V. Tchikov, and W. Schneider-Brachert, *Regulation of TNFR1 and CD95 signalling by receptor compartmentalization*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. 9: p. 655-662.
96. Heinrich, M., J. Neumeier, M. Jakob, C. Hallas, V. Tchikov, S. Winoto-Morbach, M. Wickel, W. Schneider-Brachert, A. Trauzold, A. Hethke, and S. Schutze, *Cathepsin D links TNF-induced acid sphingomyelinase to Bid-mediated caspase-9 and -3 activation*. Cell Death Differ, 2004. 11: p. 550-563.
97. Langner, J., S. Ansorge, M. Heinrich, M. Wickel, S. Winoto-Morbach, W. Schneider-Brachert, T. Weber, J. Brunner, P. Saftig, C. Peters, M. Krönke, and S. Schütze, *Ceramide as an Activator Lipid of Cathepsin D*, in *Cellular Peptidases in Immune Functions and Diseases 2*. 2002, Springer Netherlands. p. 305-315.
98. Chan, F.K.-M., J. Shisler, J.G. Bixby, M. Felices, L. Zheng, M. Appel, J. Orenstein, B. Moss, and M.J. Lenardo, *A Role for Tumor Necrosis Factor Receptor-2 and Receptor-interacting Protein in Programmed Necrosis and Antiviral Responses*. Journal of Biological Chemistry, 2003. 278: p. 51613-51621.
99. Nakao, S., Y. Ogtata, E. Shimizu, M. Yamazaki, S. Furuyama, and H. Sugiya, *Tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )-induced prostaglandin E2 release is mediated by the activation of cyclooxygenase-2 (COX-2) transcription via NF $\kappa$ B in human gingival fibroblasts* Molecular and Cellular Biochemistry, 2002. 238: p. 11-18.
100. Jobin, Morteau, Han, and S. Balfour, *Specific NF- $\kappa$ B blockade selectively inhibits tumour necrosis factor- $\alpha$ -induced COX-2 but not constitutive COX-1 gene expression in HT-29 cells*. Immunology, 1998. 95: p. 537-543.
101. Kerr JF, Wyllie AH, and C. AR., *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics*. British Journal of Cancer, 1972. 26: p. 239-257.
102. Meier, P., A. Finch, and G. Evan, *Apoptosis in development*. Nature, 2000. 407: p. 796-801.

103. Nijhawan, D., N. Honarpour, and X. Wang, *Apoptosis in Neural Development and Disease*. Annual Review of Neuroscience, 2000. 23: p. 73-87.
104. Fisher, S.A., B.L. Langille, and D. Srivastava, *Apoptosis During Cardiovascular Development*. Circ Res, 2000. 87: p. 856-864.
105. Siu, P.M. and S.E. Alway, *Age-related apoptotic responses to stretch-induced hypertrophy in quail slow-tonic skeletal muscle*. American Journal of Physiology - Cell Physiology, 2005. 289: p. C1105-C1113.
106. Zainullin, V.G. and A.A. Moskalev, *Role of Apoptosis in Age-Related Pathologies*. Russian Journal of Developmental Biology, 2001. 32: p. 199-204.
107. Zhu, C., X. Wang, F. Xu, B.A. Bahr, M. Shibata, Y. Uchiyama, H. Hagberg, and K. Blomgren, *The influence of age on apoptotic and other mechanisms of cell death after cerebral hypoxia-ischemia*. Cell Death Differ, 2004. 12: p. 162-176.
108. Vallat, L., H. Magdel 曠 nat, H. Merle-B 曠 ral, P. Masdehors, G. Potocki de Montalk, F. Davi, M. Kruhoffer, L. Sabatier, T.F. Orntoft, and J. Delic, *The resistance of B-CLL cells to DNA damage?induced apoptosis defined by DNA microarrays*. Blood, 2003. 101: p. 4598-4606.
109. Li, C.-Q., L.J. Trudel, and G.N. Wogan, *Nitric Oxide-Induced Genotoxicity, Mitochondrial Damage, and Apoptosis in Human Lymphoblastoid Cells Expressing Wild-Type and Mutant p53*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002. 99: p. 10364-10369.
110. Paris, F., Z. Fuks, A. Kang, P. Capodici, G. Juan, D. Ehleiter, A. Haimovitz-Friedman, C. Cordon-Cardo, and R. Kolesnick, *Endothelial Apoptosis as the Primary Lesion Initiating Intestinal Radiation Damage in Mice*. Science, 2001. 293: p. 293-297.
111. Kagan, V.E., B. Gleiss, Y.Y. Tyurina, V.A. Tyurin, C. Elenstr 曠 m-Magnusson, S.-X. Liu, F.B. Serinkan, A. Arroyo, J. Chandra, S. Orrenius, and B. Fadeel, *A Role for Oxidative Stress in Apoptosis: Oxidation and Externalization of Phosphatidylserine Is Required for Macrophage Clearance of Cells Undergoing Fas-Mediated Apoptosis*. The Journal of Immunology, 2002. 169: p. 487-499.
112. Fesik, S.W., *Promoting apoptosis as a strategy for cancer drug discovery*. Nat Rev Cancer, 2005. 5: p. 876-885.
113. Norbury, C.J. and B. Zhivotovsky, *DNA damage-induced apoptosis*. Oncogene, 2004. 23: p. 2797-2808.
114. Dewey, W.C., C.C. Ling, and R.E. Meyn, *Radiation-induced apoptosis: Relevance to radiotherapy*. International Journal of Radiation Oncology\*Biophysics, 1995. 33: p. 781-796.
115. Itoh, K., H. Hase, H. Kojima, K. Saotome, K. Nishioka, and T. Kobata, *Central role of mitochondria and p53 in Fas-mediated apoptosis of rheumatoid synovial fibroblasts*. Rheumatology, 2004. 43: p. 277-285.

116. Rath, P.C. and B.B. Aggarwal, *TNF-Induced Signaling in Apoptosis*. Journal of Clinical Immunology, 1999. 19: p. 350-364.
117. Ross, J.S., J.A. Fletcher, K.J. Bloom, G.P. Linette, J. Stec, W.F. Symmans, L. Pusztai, and G.N. Hortobagyi, *Targeted Therapy in Breast Cancer*. Molecular & Cellular Proteomics, 2004. 3: p. 379-398.
118. Fulda, S. and K.M. Debatin, *Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy*. Oncogene, 2006. 25: p. 4798-4811.
119. López-Hernández, F., M. Ortiz, and F. Piedrafita, *The extrinsic and intrinsic apoptotic pathways are differentially affected by temperature upstream of mitochondrial damage*. Apoptosis, 2006. 11: p. 1339-1347.
120. Huang, D.-M., Y.-C. Shen, C. Wu, Y.-T. Huang, F.-L. Kung, C.-M. Teng, and J.-H. Guh, *Investigation of extrinsic and intrinsic apoptosis pathways of new clerodane diterpenoids in human prostate cancer PC-3 cells*. European Journal of Pharmacology, 2004. 503: p. 17-24.
121. Ying, S.X., S. Seal, N. Abbassi, Hockenbery, David M.Kiem, Hans-Peter, X. Li, Pagel, J. M., A.K. Gopal, and H.J. Deeg, *Differential effects of bexarotene on intrinsic and extrinsic pathways in TRAIL-induced apoptosis in two myeloid leukemia cell lines*. Leukemia and Lymphoma, 2007. 48: p. 1003-1014.
122. Lavrik, I., A. Krueger, I. Schmitz, S. Baumann, H. Weyd, P.H. Krammer, and S. Kirchhoff, *The active caspase-8 heterotetramer is formed at the CD95 DISC*. Cell Death Differ, 2003. 10: p. 144-145.
123. van den Brink, M.R.M. and S.J. Burakoff, *Cytolytic pathways in haematopoietic stem-cell transplantation*. Nat Rev Immunol, 2002. 2: p. 273-281.
124. Supinski, G.S., X. Ji, W. Wang, and L.A. Callahan, *The extrinsic caspase pathway modulates endotoxin-induced diaphragm contractile dysfunction*. Journal of Applied Physiology, 2007. 102: p. 1649-1657.
125. Stennicke, H.R., J.M. J 羹rgensmeier, H. Shin, Q. Deveraux, B.B. Wolf, X. Yang, Q. Zhou, H.M. Ellerby, L.M. Ellerby, D. Bredesen, D.R. Green, J.C. Reed, C.J. Froelich, and G.S. Salvesen, *Pro-caspase-3 Is a Major Physiologic Target of Caspase-8*. Journal of Biological Chemistry, 1998. 273: p. 27084-27090.
126. Earnshaw, W.C., L.M. Martins, and S.H. Kaufmann, *MAMMALIAN CASPASES: Structure, Activation, Substrates, and Functions During Apoptosis*. Annual Review of Biochemistry, 1999. 68: p. 383-424.
127. Li, H., H. Zhu, C.-j. Xu, and J. Yuan, *Cleavage of BID by Caspase 8 Mediates the Mitochondrial Damage in the Fas Pathway of Apoptosis*. Cell, 1998. 94: p. 491-501.
128. Henshall, D.C., D.P. Bonislawski, S.L. Skradski, J.-Q. Lan, R. Meller, and R.P. Simon, *Cleavage of Bid May Amplify Caspase-8-Induced Neuronal Death Following Focally Evoked Limbic Seizures*. Neurobiology of Disease, 2001. 8: p. 568-580.



129. Tang, D., J.M. Lahti, and V.J. Kidd, *Caspase-8 Activation and Bid Cleavage Contribute to MCF7 Cellular Execution in a Caspase-3-dependent Manner during Staurosporine-mediated Apoptosis*. *Journal of Biological Chemistry*, 2000. 275: p. 9303-9307.
130. Gentile, M., L. Latonen, and M. Laiho, *Cell cycle arrest and apoptosis provoked by UV radiation? Induced DNA damage are transcriptionally highly divergent responses*. *Nucleic Acids Research*, 2003. 31: p. 4779-4790.
131. Wang, X., D. Ou, J. Yin, G. Wu, and J. Wang, *Proteomic analysis reveals altered expression of proteins related to glutathione metabolism and apoptosis in the small intestine of zinc oxide-supplemented piglets*. *Amino Acids*, 2009. 37: p. 209-218.
132. Cheng, E.H.Y.A., M.C. Wei, S. Weiler, R.A. Flavell, T.W. Mak, T. Lindsten, and S.J. Korsmeyer, *BCL-2, BCL-XL Sequester BH3 Domain-Only Molecules Preventing BAX- and BAK-Mediated Mitochondrial Apoptosis*. *Molecular Cell*, 2001. 8: p. 705-711.
133. Kodama, T., T. Takehara, H. Hikita, S. Shimizu, M. Shigekawa, W. Li, T. Miyagi, A. Hosui, T. Tatsumi, H. Ishida, T. Kanto, N. Hiramatsu, X.-M. Yin, and N. Hayashi, *BH3-only activator proteins, Bid and Bim, are dispensable for Bak/Bax-dependent thrombocyte apoptosis induced by Bcl-xL deficiency: Molecular requisites for the mitochondrial pathway to apoptosis in platelets*. *Journal of Biological Chemistry*, 2011.
134. Ren, D., H.-C. Tu, H. Kim, G.X. Wang, G.R. Bean, O. Takeuchi, J.R. Jeffers, G.P. Zambetti, J.J.D. Hsieh, and E.H.Y. Cheng, *BID, BIM, and PUMA Are Essential for Activation of the BAX- and BAK-Dependent Cell Death Program*. *Science*, 2010. 330: p. 1390-1393.
135. Bassik, M.C., L. Scorrano, S.A. Oakes, T. Pozzan, and S.J. Korsmeyer, *Phosphorylation of BCL-2 regulates ER Ca<sup>2+</sup> homeostasis and apoptosis*. *EMBO J*, 2004. 23: p. 1207-1216.
136. Park, K.S., D. Poburko, C.B. Wollheim, and N. Demaurex, *Amiloride derivatives induce apoptosis by depleting ER Ca<sup>2+</sup> stores in vascular endothelial cells*. *British Journal of Pharmacology*, 2009. 156: p. 1296-1304.
137. Nakano, T., H. Watanabe, M. Ozeki, M. Asai, H. Katoh, H. Satoh, and H. Hayashi, *Endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> depletion induces endothelial cell apoptosis independently of caspase-12*. *Cardiovascular Research*, 2006. 69: p. 908-915.
138. Adrain, C., E.M. Creagh, and S.J. Martin, *Apoptosis-associated release of Smac/DIABLO from mitochondria requires active caspases and is blocked by Bcl-2*. *EMBO J*, 2001. 20: p. 6627-6636.
139. Kohli, M., J. Yu, C. Seaman, A. Bardelli, K.W. Kinzler, B. Vogelstein, C. Lengauer, and L. Zhang, *SMAC/Diablo-dependent apoptosis induced by nonsteroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs) in colon cancer cells*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004. 101: p. 16897-16902.
140. Dugas, E., D. Nochy, L. Ravagnan, M. Loeffler, S.A. Susin, N. Zamzami, and G.



- Kroemer, *Apoptosis-inducing factor (AIF): a ubiquitous mitochondrial oxidoreductase involved in apoptosis*. FEBS Letters, 2000. 476: p. 118-123.
141. Penninger, J.M. and G. Kroemer, *Mitochondria, AIF and caspases - rivaling for cell death execution*. Nat Cell Biol, 2003. 5: p. 97-99.
  142. Baliga, B. and S. Kumar, *Apaf-1//cytochrome c apoptosome: an essential initiator of caspase activation or just a sideshow?* Cell Death Differ, 2003. 10: p. 16-18.
  143. Zou, H., Y. Li, X. Liu, and X. Wang, *An APAF-1.Cytochrome c Multimeric Complex Is a Functional Apoptosome That Activates Procaspase-9*. Journal of Biological Chemistry, 1999. 274: p. 11549-11556.
  144. McKay, T.R., S. Bell, T. Tenev, V. Stoll, R. Lopes, N.R. Lemoine, and I.A. McNeish, *Procaspase 3 expression in ovarian carcinoma cells increases survivin transcription which can be countered with a dominant-negative mutant, survivin T34A; a combination gene therapy strategy*. Oncogene, 2003. 22: p. 3539-3547.
  145. Little, S.A., W.K. Kim, and P.E. Mirkes, *Teratogen-induced activation of caspase-6 and caspase-7 in early postimplantation mouse embryos*. Cell Biology and Toxicology, 2003. 19: p. 215-226.
  146. Jimenez, F., S. Aiba, Masago, I. Al Hashimi, N. Vela, Koch, G. Fernandes, C. Yeh, N. Talal, and H. Dang, *Activated caspase 3 and cleaved poly(ADP-ribose)polymerase in salivary epithelium suggest a pathogenetic mechanism for Sjögren's syndrome*. Rheumatology, 2002. 41: p. 338-342.
  147. Shimizu, T., C.-X. Cao, R.-G. Shao, and Y. Pommier, *Lamin B Phosphorylation by Protein Kinase Ca and Proteolysis during Apoptosis in Human Leukemia HL60 Cells*. Journal of Biological Chemistry, 1998. 273: p. 8669-8674.
  148. Okinaga, T., H. Kasai, T. Tsujisawa, and T. Nishihara, *Role of caspases in cleavage of lamin A/C and PARP during apoptosis in macrophages infected with a periodontopathic bacterium*. Journal of Medical Microbiology, 2007. 56: p. 1399-1404.
  149. Li, W.J. and S.-J. Oh, *Diabetic cystopathy is associated with PARP/JNK/ mitochondrial apoptotic pathway-mediated bladder apoptosis*. Neurourology and Urodynamics, 2010. 29: p. 1332-1337.
  150. Perdoni, F., M.G. Bottone, C. Soldani, P. Veneroni, C. Alpini, C. Pellicciari, and A.I. Scovassi, *Distribution of Centromeric Proteins and PARP-1 during Mitosis and Apoptosis*. Annals of the New York Academy of Sciences, 2009. 1171: p. 32-37.
  151. Schult, C., M. Dahlhaus, S. Ruck, M. Sawitzky, F. Amoroso, S. Lange, D. Etro, A. Glass, G. Fuellen, S. Boldt, O. Wolkenhauer, L. Neri, M. Freund, and C. Junghans, *The multikinase inhibitor Sorafenib displays significant antiproliferative effects and induces apoptosis via caspase 3, 7 and PARP in B- and T-lymphoblastic cells*. BMC Cancer, 2010. 10: p. 560.
  152. Jemal, A., R. Siegel, J. Xu, and E. Ward, *Cancer statistics, 2010*. CA: a cancer journal

- for clinicians, 2010: p. caac. 20073v1.
153. Cole, S., G. Bhardwaj, J. Gerlach, J. Mackie, C. Grant, K. Almquist, A. Stewart, E. Kurz, A. Duncan, and R. Deeley, *Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line*. *Science*, 1992. 258: p. 1650.
  154. Uematsu, K., B. He, L. You, Z. Xu, F. McCormick, and D.M. Jablons, *Activation of the Wnt pathway in non small cell lung cancer: evidence of dishevelled overexpression*. *Oncogene*, 2003. 22: p. 7218-7221.
  155. Bhushan, B., *Handbook of nanotechnology*. Vol. 1. 2007: Springer.
  156. Dreher, K.L., *Health and environmental impact of nanotechnology: toxicological assessment of manufactured nanoparticles*. *Toxicological Sciences*, 2004. 77: p. 3.
  157. Rosi, N.L. and C.A. Mirkin, *Nanostructures in biodiagnostics*. *Chemical reviews*, 2005. 105: p. 1547-1562.
  158. Gorin, D.A., S.A. Portnov, O.A. Inozemtseva, Z. Luklinska, A.M. Yashchenok, A.M. Pavlov, A.G. Skirtach, H. Mohwald, and G.B. Sukhorukov, *Magnetic/gold nanoparticle functionalized biocompatible microcapsules with sensitivity to laser irradiation*. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2008. 10: p. 6899-6905.
  159. Hong, B. and K.A. Kang, *Biocompatible, nanogold-particle fluorescence enhancer for fluorophore mediated, optical immunosensor*. *Biosensors and Bioelectronics*, 2006. 21: p. 1333-1338.
  160. Yasutake, M., Y. Shirakawabe, T. Okawa, S. Mizooka, and Y. Nakayama, *Performance of the carbon nano-tube assembled tip for surface shape characterization*. *Ultramicroscopy*, 2002. 91: p. 57-62.
  161. Javey, A., J. Guo, Q. Wang, M. Lundstrom, and H. Dai, *Ballistic carbon nanotube field-effect transistors*. *Nature*, 2003. 424: p. 654-657.
  162. Isobe, H., T. Tanaka, R. Maeda, E. Noiri, N. Solin, M. Yudasaka, S. Iijima, and E. Nakamura, *Preparation, Purification, Characterization, and Cytotoxicity Assessment of Water-Soluble, Transition-Metal-Free Carbon Nanotube Aggregates*. *Angewandte Chemie International Edition*, 2006. 45: p. 6676-6680.
  163. Panessa-Warren, B.J., M.M. Maye, J.B. Warren, and K.M. Crosson, *Single walled carbon nanotube reactivity and cytotoxicity following extended aqueous exposure*. *Environmental Pollution*, 2009. 157: p. 1140-1151.
  164. Chen, X., A. Kis, A. Zettl, and C.R. Bertozzi, *A cell nanoinjector based on carbon nanotubes*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2007. 104: p. 8218-8222.
  165. Tiwari, S., G.P. Agrawal, and S.P. Vyas, *Molecular basis of the mucosal immune system: from fundamental concepts to advances in liposome-based vaccines*. *Nanomedicine*, 2010. 5: p. 1617-1640.
  166. Kuijpers, S.A., M.J. Coimbra, G. Storm, and R.M. Schiffelers, *Liposomes targeting*

- tumour stromal cells*. *Molecular Membrane Biology*, 2010. 27: p. 328-340.
167. Misra, R., S. Acharya, and S.K. Sahoo, *Cancer nanotechnology: application of nanotechnology in cancer therapy*. *Drug Discovery Today*, 2010. 15: p. 842-850.
  168. Kim, S., Y.T. Lim, E.G. Soltesz, A.M. De Grand, J. Lee, A. Nakayama, J.A. Parker, T. Mihaljevic, R.G. Laurence, D.M. Dor, L.H. Cohn, M.G. Bawendi, and J.V. Frangioni, *Near-infrared fluorescent type II quantum dots for sentinel lymph node mapping*. *Nat Biotech*, 2004. 22: p. 93-97.
  169. Yu, W.W., E. Chang, R. Drezek, and V.L. Colvin, *Water-soluble quantum dots for biomedical applications*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2006. 348: p. 781-786.
  170. Yaghini, E., A.M. Seifalian, and A.J. MacRobert, *Quantum dots and their potential biomedical applications in photosensitization for photodynamic therapy*. *Nanomedicine*, 2009. 4: p. 353-363.
  171. Fu, C.-C., H.-Y. Lee, K. Chen, T.-S. Lim, H.-Y. Wu, P.-K. Lin, P.-K. Wei, P.-H. Tsao, H.-C. Chang, and W. Fann, *Characterization and application of single fluorescent nanodiamonds as cellular biomarkers*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2007. 104: p. 727-732.
  172. Tisler, J., G. Balasubramanian, B. Naydenov, R. Kolesov, B. Grotz, R. Reuter, J.-P. Boudou, P.A. Curmi, M. Sennour, A. Thorel, M. Bo?rsch, K. Aulenbacher, R. Erdmann, P.R. Hemmer, F. Jelezko, and J.r. Wrachtrup, *Fluorescence and Spin Properties of Defects in Single Digit Nanodiamonds*. *ACS Nano*, 2009. 3: p. 1959-1965.
  173. Furukawa, S. and T. Miyasato, *Quantum size effects on the optical band gap of microcrystalline Si:H*. *Physical Review B*, 1988. 38: p. 5726.
  174. Ma, X. and W. Shi, *Investigation of quantum size effect of laser induced CdS quantum dots in sulfonic group polyaniline (SPAN) film*. *Microelectronic Engineering*, 2003. 66: p. 153-158.
  175. Li, J., Y. Zhu, W. Li, X. Zhang, Y. Peng, and Q. Huang, *Nanodiamonds as intracellular transporters of chemotherapeutic drug*. *Biomaterials*, 2010. 31: p. 8410-8418.
  176. Purtoy, K., A. Petunin, A. Burov, A. Puzyr, and V. Bondar, *Nanodiamonds as Carriers for Address Delivery of Biologically Active Substances*. *Nanoscale Research Letters*, 2010. 5: p. 631-636.
  177. Kuang-Kai, L. and et al., *Covalent linkage of nanodiamond-paclitaxel for drug delivery and cancer therapy*. *Nanotechnology*, 2010. 21: p. 315106.
  178. Chang, C.-C., P.-H. Chen, H.-L. Chu, T.-C. Lee, C.-C. Chou, J.-I. Chao, C.-Y. Su, J.S. Chen, J.-S. Tsai, C.-M. Tsai, Y.-P. Ho, K.W. Sun, C.-L. Cheng, and F.-R. Chen, *Laser induced popcornlike conformational transition of nanodiamond as a nanoknife*. *Applied Physics Letters*, 2008. 93: p. 033905-3.

179. Kim, K.-Y., *Multiphoton effect in the optical-absorption spectra of free polarons*. Physical Review B, 1979. 19: p. 6610.
180. Farkas, G., I. Kertész, Z. Némethy, and P. Varga, *On the laser-induced non-linear photoelectric effect in metals*. Physics Letters A, 1967. 25: p. 572-573.
181. P P Calmettes and M.W. Berns, *Laser-induced multiphoton processes in living cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1983. 80: p. 7197-7199.
182. Hermanson, G.T., *Bioconjugate Techniques*. 1996, San Diego: Academic Press.
183. Binnig, G., C.F. Quate, and C. Gerber, *Atomic force microscope*. Physical review letters, 1986. 56: p. 930-933.
184. Velegol, S.B. and B.E. Logan, *Contributions of bacterial surface polymers, electrostatics, and cell elasticity to the shape of AFM force curves*. Langmuir, 2002. 18: p. 5256-5262.
185. Zhang, Y., J. Zhang, X. Li, S. Zhang, and X. Zhou. *Transfer Function Design Using Acting Force Model*. 2009: IEEE.
186. Quate, C. and C. Gerber, *Atomic Force Microscopy*.
187. Lal, J., D. Abernathy, L. Auvray, O. Diat, and G. Grubel, *Dynamics and correlations in magnetic colloidal systems studied by x-ray photon correlation spectroscopy*. The European Physical Journal E: Soft Matter and Biological Physics, 2001. 4: p. 263-271.
188. Weitz, D., D. Pine, P. Pusey, and R. Tough, *Nondiffusive Brownian motion studied by diffusing-wave spectroscopy*. Physical review letters, 1989. 63: p. 1747-1750.
189. Geusic, J., H.M. Marcos, and L.G. Van Uitert, *LASER OSCILLATIONS IN Nd DOPED YTTRIUM ALUMINUM, YTTRIUM GALLIUM AND GADOLINIUM GARNETS*. Applied physics letters, 1964. 4: p. 182-184.
190. Tobin, M.C., *Raman spectra of crystalline lysozyme, pepsin, and alpha chymotrypsin*. Science, 1968. 161: p. 68.
191. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Analytical biochemistry, 1976. 72: p. 248-254.
192. Stearns, J.A., S. Mercier, C. Seaiby, M. Guidi, O.V. Boyarkin, and T.R. Rizzo, *Conformation-specific spectroscopy and photodissociation of cold, protonated tyrosine and phenylalanine*. Journal of the American Chemical Society, 2007. 129: p. 11814-11820.
193. Wen, B., J. Zhao, and T. Li, *Relative stability of hydrogenated nanodiamond and nanographite from density function theory*. Chemical Physics Letters, 2007. 441: p. 318-321.
194. Gentile, M., L. Latonen, and M. Laiho, *Cell cycle arrest and apoptosis provoked by UV radiation induced DNA damage are transcriptionally highly divergent responses*.

- Nucleic acids research, 2003. 31: p. 4779.
195. de Gruijl, F.R., H.J. van Kranen, and L.H.F. Mullenders, *UV-induced DNA damage, repair, mutations and oncogenic pathways in skin cancer*. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 2001. 63: p. 19-27.
  196. Ravanat, J.L., T. Douki, and J. Cadet, *Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components*. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 2001. 63: p. 88-102.
  197. Baselga, J., *Why the epidermal growth factor receptor? The rationale for cancer therapy*. The Oncologist, 2002. 7: p. 2.
  198. Hansen, L.H., X. Wang, J.J. Kopchick, P. Bouchelouche, J.H. Nielsen, E.D. Galsgaard, and N. Billestrup, *Identification of tyrosine residues in the intracellular domain of the growth hormone receptor required for transcriptional signaling and Stat5 activation*. Journal of Biological Chemistry, 1996. 271: p. 12669.
  199. Clar, H., U. Langsenlehner, P. Krippel, W. Renner, A. Leithner, G. Gruber, G. Hofmann, B. Yazdani-Biuki, T. Langsenlehner, and R. Windhager, *A polymorphism in the G protein  $\beta$ 3-subunit gene is associated with bone metastasis risk in breast cancer patients*. Breast cancer research and treatment, 2008. 111: p. 449-452.
  200. McPherson, K., C. Steel, and J. Dixon, *ABC of breast diseases. Breast cancer--epidemiology, risk factors and genetics*. BMJ: British Medical Journal, 1994. 309: p. 1003.
  201. Ray, J. and W. Stetler-Stevenson, *The role of matrix metalloproteases and their inhibitors in tumour invasion, metastasis and angiogenesis*. European Respiratory Journal, 1994. 7: p. 2062.
  202. Shuen, A. and W. Foulkes, *Inherited Mutations in Breast Cancer Genes—Risk and Response*. Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia, 2011. 16: p. 3-15.
  203. Narod, S.A., *Genetic variants associated with breast-cancer risk*. The Lancet Oncology, 2011. 12: p. 415-416.
  204. Liang, H., Y. Zhong, Y. Huang, and G. Chen, *Type 1 receptor parathyroid hormone (PTH1R) influences breast cancer cell proliferation and apoptosis induced by high levels of glucose*. Medical Oncology, 2011: p. 1-7.
  205. Key, T.J., *Fruit and vegetables and cancer risk*. Br J Cancer, 2011. 104: p. 6-11.
  206. Irwin, M.L., C. Duggan, C.-Y. Wang, A.W. Smith, A. McTiernan, R.N. Baumgartner, K.B. Baumgartner, L. Bernstein, and R. Ballard-Barbash, *Fasting C-Peptide Levels and Death Resulting From All Causes and Breast Cancer: The Health, Eating, Activity, and Lifestyle Study*. Journal of Clinical Oncology, 2011. 29: p. 47-53.
  207. He, J.-R., L.-Y. Tang, D.-D. Yu, F.-X. Su, E.-W. Song, Y. Lin, S.-M. Wang, G.-C. Lai, W.-Q. Chen, and Z.-F. Ren, *Epstein-Barr virus and breast cancer: Serological study in a high-incidence area of nasopharyngeal carcinoma*. Cancer Letters, 2011. In Press,



208. Aguayo, F., N. Kahn, C. Koriyama, C. Gonzalez, S. Ampuero, O. Padilla, L. Solis, Y. Eizuru, A. Corvalan, and S. Akiba, *Human papillomavirus and Epstein Barr virus infections in breast cancer from Chile*. *Infectious Agents and Cancer*, 2011. 6: p. 7.
209. Wang, X., S. Tu, J. Tan, T. Tian, L. Ran, J.-F. Rodier, and G. Ren, *REG gamma: a potential marker in breast cancer and effect on cell cycle and proliferation of breast cancer cell*. *Medical Oncology*, 2010. 28: p. 31-41.
210. Pontillo, C.A., M.A. Garcia, D. Pena, C. Cocca, F. Chiappini, L. Alvarez, D. Kleiman de Pisarev, and A.S. Randi, *Activation of c-Src/HER1/STAT5b and HER1/ERK1/2 Signaling Pathways and Cell Migration by Hexachlorobenzene in MDA-MB-231 Human Breast Cancer Cell Line*. *Toxicological Sciences*, 2011. 120: p. 284-296.
211. Aksamitiene, E., S. Achanta, W. Kolch, B.N. Kholodenko, J.B. Hoek, and A. Kiyatkin, *Prolactin-stimulated activation of ERK1/2 mitogen-activated protein kinases is controlled by PI3-kinase/Rac/PAK signaling pathway in breast cancer cells*. *Cellular Signalling*, 2011. In Press, Uncorrected Proof.
212. Mantovani, A., P. Allavena, A. Sica, and F. Balkwill, *Cancer-related inflammation*. *Nature*, 2008. 454: p. 436-444.
213. Whiteside, T., *The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth*. *Oncogene*, 2008. 27: p. 5904-5912.
214. Lewis, C.E. and J.W. Pollard, *Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments*. *Cancer Research*, 2006. 66: p. 605.
215. Mantovani, A., T. Schioppa, C. Porta, P. Allavena, and A. Sica, *Role of tumor-associated macrophages in tumor progression and invasion*. *Cancer and Metastasis Reviews*, 2006. 25: p. 315-322.
216. Leek, R.D., C.E. Lewis, R. Whitehouse, M. Greenall, J. Clarke, and A.L. Harris, *Association of macrophage infiltration with angiogenesis and prognosis in invasive breast carcinoma*. *Cancer Research*, 1996. 56: p. 4625.
217. Leek, R.D., N.C. Hunt, R.J. Landers, C.E. Lewis, J.A. Royds, and A.L. Harris, *Macrophage infiltration is associated with VEGF and EGFR expression in breast cancer*. *The Journal of pathology*, 2000. 190: p. 430-436.
218. Condeelis, J. and J.W. Pollard, *Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis*. *Cell*, 2006. 124: p. 263-266.
219. Ugucioni, M., M. D'Apuzzo, M. Loetscher, B. Dewald, and M. Baggiolini, *Actions of the chemotactic cytokines MCP 1, MCP 2, MCP 3, RANTES, MIP 1 $\alpha$  and MIP 1 $\beta$  on human monocytes*. *European journal of immunology*, 1995. 25: p. 64-68.
220. Boring, L., J. Gosling, S.W. Chensue, S.L. Kunkel, R.V. Farese Jr, H.E. Broxmeyer, and I.F. Charo, *Impaired monocyte migration and reduced type 1 (Th1) cytokine responses in CC chemokine receptor 2 knockout mice*. *Journal of Clinical*

- Investigation, 1997. 100: p. 2552.
221. Webb, S.E., J.W. Pollard, and G.E. Jones, *Direct observation and quantification of macrophage chemoattraction to the growth factor CSF-1*. Journal of Cell Science, 1996. 109: p. 793.
  222. Ming, W., L. Bersani, and A. Mantovani, *Tumor necrosis factor is chemotactic for monocytes and polymorphonuclear leukocytes*. The Journal of Immunology, 1987. 138: p. 1469.
  223. Siegbahn, A., A. Hammacher, B. Westermark, and C. Heldin, *Differential effects of the various isoforms of platelet-derived growth factor on chemotaxis of fibroblasts, monocytes, and granulocytes*. Journal of Clinical Investigation, 1990. 85: p. 916.
  224. Lin, E.Y. and J.W. Pollard, *Macrophages: modulators of breast cancer progression*. 2004.
  225. Sabe, H., S. Hashimoto, M. Morishige, E. Ogawa, A. Hashimoto, J.-M. Nam, K. Miura, H. Yano, and Y. Onodera, *The EGFR-GEP100-Arf6-AMAP1 Signaling Pathway Specific to Breast Cancer Invasion and Metastasis*. Traffic, 2009. 10: p. 982-993.
  226. Gillingham, A.K. and S. Munro, *The Small G Proteins of the Arf Family and Their Regulators*. Annual Review of Cell and Developmental Biology, 2007. 23: p. 579-611.
  227. Lebeda, R.A., S.K. Johnson, M.I. Stewart, and R.S. Haun, *Sequence, Genomic Organization, and Expression of the Human ADP-Ribosylation Factor 6 (ARF6) Gene: A Class III ARF*. DNA and Cell Biology, 2003. 22: p. 737-741.
  228. Karim, Z.A., W. Choi, and S.W. Whiteheart, *Primary Platelet Signaling Cascades and Integrin-mediated Signaling Control ADP-ribosylation Factor (Arf) 6-GTP Levels during Platelet Activation and Aggregation*. Journal of Biological Chemistry, 2008. 283: p. 11995-12003.
  229. Someya, A., J. Moss, and I. Nagaoka, *The Guanine Nucleotide Exchange Protein for ADP-ribosylation Factor 6, ARF-GEP100/BRAG2, Regulates Phagocytosis of Monocytic Phagocytes in an ARF6-dependent Process*. Journal of Biological Chemistry, 2010. 285: p. 30698-30707.
  230. Hashimoto, S., Y. Onodera, A. Hashimoto, M. Tanaka, M. Hamaguchi, A. Yamada, and H. Sabe, *Requirement for Arf6 in breast cancer invasive activities*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004. 101: p. 6647-6652.
  231. Yan, X.-l., C.-j. Fu, L. Chen, J.-h. Qin, Q. Zeng, H.-f. Yuan, X. Nan, H.-x. Chen, J.-n. Zhou, Y.-l. Lin, X.-m. Zhang, C.-z. Yu, W. Yue, and X.-t. Pei, *Mesenchymal stem cells from primary breast cancer tissue promote cancer proliferation and enhance mammosphere formation partially via EGF/EGFR/Akt pathway*. Breast Cancer Research and Treatment, 2011: p. 1-12.
  232. Herreros-Villanueva, M., M. Rodrigo, M. Claver, P. Muñiz, E. Lastra, C. García-Girón,

- and M. Coma del Corral, *KRAS, BRAF, EGFR and HER2 gene status in a Spanish population of colorectal cancer* Molecular Biology Reports, 2010. 38: p. 1315-1320.
233. Zwaenepoel, K., J. Goris, C. Erneux, P.J. Parker, and V. Janssens, *Protein phosphatase 2A PR130/B $\alpha$ 1 subunit binds to the SH2 domain-containing inositol polyphosphate 5-phosphatase 2 and prevents epidermal growth factor (EGF)-induced EGF receptor degradation sustaining EGF-mediated signaling*. The FASEB Journal, 2009. 24: p. 538-547.
234. Wang, Y. and Z. Wang, *Regulation of EGF-Induced Phospholipase C- $\gamma$ 1 Translocation and Activation by its SH2 and PH Domains*. Traffic, 2003. 4: p. 618-630.
235. Chattopadhyay, A., M. Vecchi, Q.-s. Ji, R. Mernaugh, and G. Carpenter, *The Role of Individual SH2 Domains in Mediating Association of Phospholipase C- $\gamma$ 1 with the Activated EGF Receptor* Journal of Biological Chemistry, 1999. 274: p. 26091-26097.
236. Hashimoto, S., M. Hirose, A. Hashimoto, M. Morishige, A. Yamada, H. Hosaka, K.-i. Akagi, E. Ogawa, C. Oneyama, T. Agatsuma, M. Okada, H. Kobayashi, H. Wada, H. Nakano, T. Ikegami, A. Nakagawa, and H. Sabe, *Targeting AMAP1 and cortactin binding bearing an atypical src homology 3/proline interface for prevention of breast cancer invasion and metastasis*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2006. 103: p. 7036-7041.
237. Schneider, B.P. and K.D. Miller, *Angiogenesis of Breast Cancer*. Journal of Clinical Oncology, 2005. 23: p. 1782-1790.
238. Kidd, L., G. Brock, T. VanCleave, M. Benford, N. Lavender, T. Kruer, and J. Wittliff, *Angiogenesis-associated sequence variants relative to breast cancer recurrence and survival*. Cancer Causes and Control, 2010. 21: p. 1545-1557.
239. Bendrik, C., L. Karlsson, and C. Dabrosin, *Increased endostatin generation and decreased angiogenesis via MMP-9 by tamoxifen in hormone dependent ovarian cancer*. Cancer Letters, 2009. 292: p. 32-40.
240. Møller, M.N., K. Werther, A. Nalla, S.-E. Stangerup, J. Thomsen, T.C. Bøg-Hansen, H.J. Nielsen, and P. Cayé-Thomasen, *Angiogenesis in vestibular schwannomas: Expression of extracellular matrix factors MMP-2, MMP-9, and TIMP-1*. The Laryngoscope, 2010. 120: p. 657-662.
241. Aplin, A.C., W.H. Zhu, E. Fogel, and R.F. Nicosia, *Vascular regression and survival are differentially regulated by MT1-MMP and TIMPs in the aortic ring model of angiogenesis*. American Journal of Physiology - Cell Physiology, 2009. 297: p. C471-C480.
242. Fearon, U., R. Reece, J. Smith, P. Emery, and D.J. Veale, *Synovial Cytokine and Growth Factor Regulation of MMPs/TIMPs: Implications for Erosions and Angiogenesis in Early Rheumatoid and Psoriatic Arthritis Patients*. Annals of the New York Academy of Sciences, 1999. 878: p. 619-621.
243. Weidner, N., J.P. Semple, W.R. Welch, and J. Folkman, *Tumor Angiogenesis and Metastasis - Correlation in Invasive Breast Carcinoma*. New England Journal of

- Medicine, 1991. 324: p. 1-8.
244. Gasparini, G., *Prognostic Value of Vascular Endothelial Growth Factor in Breast Cancer*. The Oncologist, 2000. 5: p. 37-44.
245. Blumenthal, R.D., H.J. Hansen, and D.M. Goldenberg, *Inhibition of adhesion, invasion, and metastasis by antibodies targeting CEACAM6 (NCA-90) and CEACAM5 (Carcinoembryonic Antigen)*. Cancer Research, 2005. 65: p. 8809.
246. Yarden, Y. and M.X. Sliwkowski, *Untangling the ErbB signalling network*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2001. 2: p. 127-137.
247. Slamon, D.J., G.M. Clark, S.G. Wong, W.J. Levin, A. Ullrich, and W.L. McGuire, *Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene*. Science, 1987. 235: p. 177.
248. Rabindran, S.K., C.M. Discafani, E.C. Rosfjord, M. Baxter, M.B. Floyd, J. Golas, W.A. Hallett, B.D. Johnson, R. Nilakantan, and E. Overbeek, *Antitumor activity of HKI-272, an orally active, irreversible inhibitor of the HER-2 tyrosine kinase*. Cancer Research, 2004. 64: p. 3958.
249. Olayioye, M.A., R.M. Neve, H.A. Lane, and N.E. Hynes, *NEW EMBO MEMBERS'REVIEW: The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer*. The EMBO journal, 2000. 19: p. 3159.
250. Pegram, M.D., R.S. Finn, K. Arzoo, M. Beryt, R.J. Pietras, and D.J. Slamon, *The effect of HER-2/neu overexpression on chemotherapeutic drug sensitivity in human breast and ovarian cancer cells*. Oncogene, 1997. 15: p. 537.
251. Yu, D. and M.C. Hung, *Overexpression of ErbB2 in cancer and ErbB2-targeting strategies*. Oncogene, 2000. 19: p. 6115.
252. Artemov, D., N. Mori, R. Ravi, and Z.M. Bhujwalla, *Magnetic resonance molecular imaging of the HER-2/neu receptor*. Cancer Research, 2003. 63: p. 2723.
253. Shao-Chun, W., Z. Lisha, G.N. Hortobagyi, and H. Mien-Chie. *Targeting HER2: recent developments and future directions for breast cancer patients*. 2001: Elsevier.
254. Nagy, P., A. Jenei, A.K. Kirsch, J. Szollosi, S. Damjanovich, and T.M. Jovin, *Activation-dependent clustering of the erbB2 receptor tyrosine kinase detected by scanning near-field optical microscopy*. Journal of Cell Science, 1999. 112: p. 1733.
255. Kaufmann, R., P. Muller, G. Hildenbrand, M. Hausmann, and C. Cremer, *Analysis of Her2/neu membrane protein clusters in different types of breast cancer cells using localization microscopy*. Journal of Microscopy, 2010.
256. Ordas, J., Y. Millan, R. Dios, C. Reymundo, and M. de las Mulas, *Proto-oncogene HER-2 in normal, dysplastic and tumorous feline mammary glands: an immunohistochemical and chromogenic in situ hybridization study*. BMC cancer, 2007. 7: p. 179.
257. Millanta, F., M. Calandrella, S. Citi, D. Della Santa, and A. Poli, *Overexpression of*



- HER-2 in feline invasive mammary carcinomas: an immunohistochemical survey and evaluation of its prognostic potential.* Veterinary Pathology Online, 2005. 42: p. 30.
258. De Maria, R., M. Olivero, S. Iussich, M. Nakaichi, T. Murata, B. Biolatti, and M.F. Di Renzo, *Spontaneous feline mammary carcinoma is a model of HER2 overexpressing poor prognosis human breast cancer.* Cancer Research, 2005. 65: p. 907.
259. Slamon, D.J., W. Godolphin, L.A. Jones, J.A. Holt, S.G. Wong, D.E. Keith, W.J. Levin, S.G. Stuart, J. Udove, and A. Ullrich, *Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer.* Science, 1989. 244: p. 707.
260. Nicholson, R.I., R.A. McClelland, J.M.W. Gee, D.L. Manning, P. Cannon, J.F.R. Robertson, I.O. Ellis, and R.W. Blamey, *Epidermal growth factor receptor expression in breast cancer: association with response to endocrine therapy.* Breast cancer research and treatment, 1994. 29: p. 117-125.
261. Disis, M.L. and M.A. Cheever, *HER-2/neu protein: a target for antigen-specific immunotherapy of human cancer.* Advances in cancer research, 1997. 71: p. 343-371.
262. Sliwkowski, M.X., J.A. Lofgren, G.D. Lewis, T.E. Hotaling, B.M. Fendly, and J.A. Fox. *Nonclinical studies addressing the mechanism of action of trastuzumab (Herceptin).* 1999: Semin Oncol.
263. Nahta, R., G.N. Hortobagyi, and F.J. Esteva, *Growth factor receptors in breast cancer: potential for therapeutic intervention.* The Oncologist, 2003. 8: p. 5.
264. Goldenberg, M.M., *Trastuzumab, a recombinant DNA-derived humanized monoclonal antibody, a novel agent for the treatment of metastatic breast cancer.* Clinical therapeutics, 1999. 21: p. 309-318.
265. Burstein, H.J., I. Kuter, S.M. Campos, R.S. Gelman, L. Tribou, L.M. Parker, J. Manola, J. Younger, U. Matulonis, and C.A. Bunnell, *Clinical activity of trastuzumab and vinorelbine in women with HER2-overexpressing metastatic breast cancer.* Journal of Clinical Oncology, 2001. 19: p. 2722.
266. Nabholz, J.M., D.M. Reese, M.A. Lindsay, and A. Riva, *HER2-positive breast cancer: update on Breast Cancer International Research Group trials.* Clinical breast cancer, 2002. 3: p. 75-79.
267. Baselga, J., D. Tripathy, J. Mendelsohn, S. Baughman, C.C. Benz, L. Dantis, N.T. Sklarin, A.D. Seidman, C.A. Hudis, and J. Moore, *Phase II study of weekly intravenous recombinant humanized anti-p185HER2 monoclonal antibody in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer.* Journal of Clinical Oncology, 1996. 14: p. 737.
268. Stebbing, J., E. Copson, and S. O'Reilly, *Herceptin (trastuzumab) in advanced breast cancer.* Cancer treatment reviews, 2000. 26: p. 287-290.
269. Laurence, D., U. Stevens, R. Bettelheim, D. Darcy, C. Leese, C. Turberville, P. Alexander, E. Johns, and A.M. Neville, *Role of plasma carcinoembryonic antigen in diagnosis of gastrointestinal, mammary, and bronchial carcinoma.* British Medical



- Journal, 1972. 3: p. 605.
270. Gold, P. and S.O. Freedman, *Demonstration of tumor-specific antigens in human colonic carcinomata by immunological tolerance and absorption techniques*. The Journal of experimental medicine, 1965. 121: p. 439.
  271. Beauchemin, N., P. Draber, G. Dveksler, P. Gold, S. Gray-Owen, F. Grunert, S. Hammarstrom, K. Holmes, A. Karlsson, and M. Kuroki, *Redefined nomenclature for members of the carcinoembryonic antigen family*. Experimental cell research, 1999. 252: p. 243.
  272. Oikawa, S., C. Inuzuka, M. Kuroki, F. Arakawa, Y. Matsuoka, G. Kosaki, and H. Nakazato, *A specific heterotypic cell adhesion activity between members of carcinoembryonic antigen family, W272 and NCA, is mediated by N-domains*. Journal of Biological Chemistry, 1991. 266: p. 7995.
  273. Jantscheff, P., L. Terracciano, A. Lowy, K. Glatz-Krieger, F. Grunert, B. Micheel, J. Brummer, U. Laffer, U. Metzger, and R. Herrmann, *Expression of CEACAM6 in resectable colorectal cancer: a factor of independent prognostic significance*. Journal of Clinical Oncology, 2003. 21: p. 3638.
  274. Ilantzis, C., L. Demarte, R.A. Screaton, and C.P. Stanners, *Deregulated expression of the human tumor marker CEA and CEA family member CEACAM6 disrupts tissue architecture and blocks colonocyte differentiation*. Neoplasia (New York, NY), 2002. 4: p. 151.
  275. Hasegawa, T., K. Isobe, Y. Tsuchiya, S. Oikawa, H. Nakazato, I. Nakashima, and K. Shimokata, *Nonspecific crossreacting antigen (NCA) is a major member of the carcinoembryonic antigen (CEA)-related gene family expressed in lung cancer*. British journal of cancer, 1993. 67: p. 58.
  276. Yasui, W., N. Oue, R. Ito, K. Kuraoka, and H. Nakayama, *Search for new biomarkers of gastric cancer through serial analysis of gene expression and its clinical implications*. Cancer science, 2004. 95: p. 385-392.
  277. Duxbury, M., H. Ito, E. Benoit, S. Ashley, and E. Whang, *CEACAM6 is a determinant of pancreatic adenocarcinoma cellular invasiveness*. British journal of cancer, 2004. 91: p. 1384-1390.
  278. Yoshioka, T., T. Masuko, H. Kotanagi, O. Aizawa, Y. Saito, H. Nakazato, K. Koyama, and Y. Hashimoto, *Homotypic adhesion through carcinoembryonic antigen plays a role in hepatic metastasis development*. Cancer science, 1998. 89: p. 177-185.
  279. Hamers-Casterman, C., T. Atarhouch, S. Muyldermans, G. Robinson, C. Hammers, E.B. Songa, N. Bendahman, and R. Hammers, *Naturally occurring antibodies devoid of light chains*. Nature 363, 1993. 446: p. 448.
  280. Muyldermans, S., T. Atarhouch, J. Saldanha, J. Barbosa, and R. Hamers, *Sequence and structure of VH domain from naturally occurring camel heavy chain immunoglobulins lacking light chains*. Protein engineering, 1994. 7: p. 1129.

281. van der Linden, R., B. de Geus, W. Stok, W. Bos, D. van Wassenaar, T. Verrrips, and L. Frenken, *Induction of immune responses and molecular cloning of the heavy chain antibody repertoire of Lama glama*. Journal of immunological methods, 2000. 240: p. 185-195.
282. Nguyen, V.K., R. Hamers, L. Wyns, and S. Muyldermans, *Camel heavy-chain antibodies: diverse germline VHH and specific mechanisms enlarge the antigen-binding repertoire*. The EMBO journal, 2000. 19: p. 921-930.
283. Vieira, J. and J. Messing, *The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers*. Gene, 1982. 19: p. 259-268.
284. Hoedemaeker, F.J., T. Signorelli, K. Johns, D.A. Kuntz, and D.R. Rose, *A single chain Fv fragment of P-glycoprotein-specific monoclonal antibody C219*. Journal of Biological Chemistry, 1997. 272: p. 29784.
285. Tanha, J., A. Muruganandam, and D. Stanimirovic, *Phage display technology for identifying specific antigens on brain endothelial cells*. Methods in molecular medicine, 2003. 89: p. 435-450.
286. Braut-Boucher, F., J. Pichon, P. Rat, M. Adolphe, M. Aubery, and J. Font, *A non-isotopic, highly sensitive, fluorimetric, cell-cell adhesion microplate assay using calcein AM-labeled lymphocytes*. Journal of immunological methods, 1995. 178: p. 41-51.
287. Verhoven, B., R.A. Schlegel, and P. Williamson, *Mechanisms of phosphatidylserine exposure, a phagocyte recognition signal, on apoptotic T lymphocytes*. The Journal of experimental medicine, 1995. 182: p. 1597.
288. Waring, P., D. Lambert, A. Sjaarda, A. Hurne, and J. Beaver, *Increased cell surface exposure of phosphatidylserine on propidium iodide negative thymocytes undergoing death by necrosis*. Cell death and differentiation, 1999. 6: p. 624.
289. Lecoeur, H., *Nuclear apoptosis detection by flow cytometry: influence of endogenous endonucleases*. Experimental cell research, 2002. 277: p. 1-14.
290. Levenson, A.S. and V.C. Jordan, *MCF-7: the first hormone-responsive breast cancer cell line*. Cancer Research, 1997. 57: p. 3071.
291. Engel, L.W. and N.A. Young, *Human breast carcinoma cells in continuous culture: a review*. Cancer Research, 1978. 38: p. 4327.
292. Soule, H., J. Vazquez, A. Long, S. Albert, and M. Brennan, *A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma*. Journal of the National Cancer Institute, 1973. 51: p. 1409.
293. Dumoulin, M., K. Conrath, A. Van Meirhaeghe, F. Meersman, K. Heremans, L.G.J. Frenken, S. Muyldermans, L. Wyns, and A. Matagne, *Single domain antibody fragments with high conformational stability*. Protein science, 2002. 11: p. 500-515.

294. Wesolowski, J., V. Alzogaray, J. Reyelt, M. Unger, K. Juarez, M. Urrutia, A. Cauerrhff, W. Danquah, B. Rissiek, and F. Scheuplein, *Single domain antibodies: promising experimental and therapeutic tools in infection and immunity*. Medical microbiology and immunology, 2009. 198: p. 157-174.
295. Buchholz, T.A., D.W. Davis, D.J. McConkey, W.F. Symmans, V. Valero, A. Jhingran, S.L. Tucker, L. Pusztai, M. Cristofanilli, and F.J. Esteva, *Chemotherapy-induced apoptosis and Bcl-2 levels correlate with breast cancer response to chemotherapy*. The Cancer Journal, 2003. 9: p. 33.
296. Clark, A.S., K. West, S. Streicher, and P.A. Dennis, *Constitutive and inducible Akt activity promotes resistance to chemotherapy, trastuzumab, or tamoxifen in breast cancer cells*. Molecular cancer therapeutics, 2002. 1: p. 707.
297. Jin, K., X. Kong, T. Shah, M.-F. Penet, F. Wildes, D.C. Sgroi, X.-J. Ma, Y. Huang, A. Kallioniemi, G. Landberg, I. Bieche, X. Wu, P.E. Lobie, N.E. Davidson, Z.M. Bhujwalla, T. Zhu, and S. Sukumar, *The HOXB7 protein renders breast cancer cells resistant to tamoxifen through activation of the EGFR pathway*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2011.
298. Jimenez, R.E., W. Hartwig, B.A. Antoniu, C.C. Compton, A.L. Warshaw, and C. Fernandez-del Castillo, *Effect of matrix metalloproteinase inhibition on pancreatic cancer invasion and metastasis: an additive strategy for cancer control*. Annals of surgery, 2000. 231: p. 644.
299. Itoh, T., M. Tanioka, H. Yoshida, T. Yoshioka, H. Nishimoto, and S. Itohara, *Reduced angiogenesis and tumor progression in gelatinase A-deficient mice*. Cancer Research, 1998. 58: p. 1048.
300. Brooks, P.C., S. Silletti, T.L. von Schalscha, M. Friedlander, and D.A. Cheresh, *Disruption of angiogenesis by PEX, a noncatalytic metalloproteinase fragment with integrin binding activity*. Cell, 1998. 92: p. 391-400.
301. Turpeenniemi-Hujanen, T., *Gelatinases (MMP-2 and-9) and their natural inhibitors as prognostic indicators in solid cancers*. Biochimie, 2005. 87: p. 287-297.
302. Azzam, H.S., G. Arand, M.E. Lippman, and E.W. Thompson, *Association of MMP-2 activation potential with metastatic progression in human breast cancer cell lines independent of MMP-2 production*. Journal of the National Cancer Institute, 1993. 85: p. 1758.
303. Pellikainen, J.M., K.M. Ropponen, V.V. Kataja, J.K. Kellokoski, M.J. Eskelinen, and V.M. Kosma, *Expression of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in breast cancer with a special reference to activator protein-2, HER2, and prognosis*. Clinical cancer research, 2004. 10: p. 7621.
304. Scorilas, A., A. Karameris, N. Arnogiannaki, A. Ardavanis, P. Bassilopoulos, T. Trangas, and M. Talieri, *Overexpression of matrix-metalloproteinase-9 in human breast cancer: a potential favourable indicator in node-negative patients*. British journal of cancer, 2001. 84: p. 1488.

305. Jinga, D., A. Blidaru, I. Condrea, C. Ardeleanu, C. Dragomir, G. Szegli, M. Stefanescu, and C. Matache, *MMP 9 and MMP 2 gelatinases and TIMP 1 and TIMP 2 inhibitors in breast cancer: correlations with prognostic factors*. Journal of cellular and molecular medicine, 2006. 10: p. 499-510.
306. Duffy, M.J., T.M. Maguire, A. Hill, E. McDermott, and N. O'Higgins, *Metalloproteinases: role in breast carcinogenesis, invasion and metastasis*. Breast Cancer Res, 2000. 2: p. 252.
307. Lewis, C. and C. Murdoch, *Macrophage responses to hypoxia: implications for tumor progression and anti-cancer therapies*. American Journal of Pathology, 2005. 167: p. 627.
308. Norris, P., R.N. Poston, D.S. Thomas, M. Thornhill, J. Hawk, and D.O. Haskard, *The expression of endothelial leukocyte adhesion molecule-1 (ELAM-1), intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in experimental cutaneous inflammation: a comparison of ultraviolet B erythema and delayed hypersensitivity*. Journal of investigative dermatology, 1991. 96: p. 763-770.
309. Solinas, G., G. Germano, A. Mantovani, and P. Allavena, *Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation*. Journal of leukocyte biology, 2009. 86: p. 1065.
310. Zeng, Z.S., A.M. Cohen, and J.G. Guillem, *Loss of basement membrane type IV collagen is associated with increased expression of metalloproteinases 2 and 9 (MMP-2 and MMP-9) during human colorectal tumorigenesis*. Carcinogenesis, 1999. 20: p. 749.
311. Corbel, M., E. Boichot, and V. Lagente, *Role of gelatinases MMP-2 and MMP-9 in tissue remodeling following acute lung injury*. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 2000. 33: p. 749-754.
312. Fidler, I.J., *The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited*. Nature Reviews Cancer, 2003. 3: p. 453-458.
313. Chau, N.M. and M. Ashcroft, *Akt 2: a role in breast cancer metastasis*. Breast Cancer Res, 2003. 6: p. 55.
314. Poola, I., B. Shokrani, R. Bhatnagar, R.L. DeWitty, Q. Yue, and G. Bonney, *Expression of carcinoembryonic antigen cell adhesion molecule 6 oncoprotein in atypical ductal hyperplastic tissues is associated with the development of invasive breast cancer*. Clinical cancer research, 2006. 12: p. 4773.
315. Sato, Y., *Molecular diagnosis of tumor angiogenesis and anti-angiogenic cancer therapy*. International Journal of Clinical Oncology, 2003. 8: p. 200-206.
316. Folkman, J., *Tumor angiogenesis: therapeutic implications*. N Engl j Med, 1971. 285: p. 1182-1186.
317. Sweeney, C.J., K.D. Miller, S.E. Sissons, S. Nozaki, D.K. Heilman, J. Shen, and G.W. Sledge, *The antiangiogenic property of docetaxel is synergistic with a recombinant*

- humanized monoclonal antibody against vascular endothelial growth factor or 2-methoxyestradiol but antagonized by endothelial growth factors*. *Cancer Research*, 2001. 61: p. 3369.
318. Hopper-Borge, E., Z.S. Chen, I. Shchaveleva, M.G. Belinsky, and G.D. Kruh, *Analysis of the Drug Resistance Profile of Multidrug Resistance Protein 7 (ABCC10)*. *Cancer Research*, 2004. 64: p. 4927.
319. Nahta, R. and F.J. Esteva, *Herceptin: mechanisms of action and resistance*. *Cancer letters*, 2006. 232: p. 123-138.
320. Masson, V., L.R. de la Ballina, C. Munaut, B. Wielockx, M. Jost, C. Maillard, S. Blacher, K. Bajou, T. Itoh, and S. Itohara, *Contribution of host MMP-2 and MMP-9 to promote tumor vascularization and invasion of malignant keratinocytes*. *The FASEB journal*, 2005. 19: p. 234.
321. Furman, R.R., J.P. Leonard, J. Decter, and M. Coleman, *Monoclonal Antibodies in Lymphomas*. *Apoptosis, Senescence, and Cancer*, 2007: p. 511-536.
322. Tang, Y., J. Wang, D.A. Scollard, H. Mondal, C. Holloway, H.J. Kahn, and R.M. Reilly, *Imaging of HER2/neu-positive BT-474 human breast cancer xenografts in athymic mice using <sup>111</sup>In-trastuzumab (Herceptin) Fab fragments*. *Nuclear medicine and biology*, 2005. 32: p. 51-58.
323. Bell, A., Z.J. Wang, M. Arbabi-Ghahroudi, T.A. Chang, Y. Durocher, U. Trojahn, J. Baardsnes, M.L. Jaramillo, S. Li, T.N. Baral, M. O'Connor-McCourt, R. MacKenzie, and J. Zhang, *Differential tumor-targeting abilities of three single-domain antibody formats*. *Cancer Letters*, 2009. 289: p. 81-90.
324. Gueorguieva, D., S. Li, N. Walsh, A. Mukerji, J. Tanha, and S. Pandey, *Identification of single-domain, Bax-specific intrabodies that confer resistance to mammalian cells against oxidative-stress-induced apoptosis*. *The FASEB journal*, 2006. 20: p. 2636.
325. McGonigal, K., J. Tanha, E. Palazov, S. Li, D. Gueorguieva-Owens, and S. Pandey, *Isolation and functional characterization of single domain antibody modulators of Caspase-3 and apoptosis*. *Applied biochemistry and biotechnology*, 2009. 157: p. 226-236.
326. Sadeqzadeh, E., F. Rahbarizadeh, D. Ahmadvand, M.J. Rasaei, L. Parhamifar, and S.M. Moghimi, *Combined MUC1-specific nanobody-tagged PEG-polyethylenimine polyplex targeting and transcriptional targeting of tBid transgene for directed killing of MUC1 over-expressing tumour cells*. *Journal of Controlled Release*, 2011. In Press, Uncorrected Proof.
327. Paz, K., L.A. Brennan, M. Iacolina, J. Doody, Y.R. Hadari, and Z. Zhu, *Human single-domain neutralizing intrabodies directed against Etk kinase: a novel approach to impair cellular transformation*. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2005. 4: p. 1801-1809.
328. Han, S.-W., P.G. Hwang, D.H. Chung, D.-W. Kim, S.-A. Im, Y.T. Kim, T.-Y. Kim, D.S. Heo, Y.-J. Bang, and N.K. Kim, *Epidermal growth factor receptor (EGFR)*



- downstream molecules as response predictive markers for gefitinib (Iressa®), ZD1839) in chemotherapy-resistant non-small cell lung cancer. International Journal of Cancer, 2005. 113: p. 109-115.*
329. Bellezza, I., S. Bracarda, C. Caserta, and A. Minelli, *Targeting of EGFR tyrosine kinase by ZD1839 ("Iressa") in androgen-responsive prostate cancer in vitro. Molecular Genetics and Metabolism, 2006. 88: p. 114-122.*
330. Mintz-Hittner, H.A., *Avastin as monotherapy for retinopathy of prematurity. Journal of American Association for Pediatric Ophthalmology and Strabismus, 2010. 14: p. 2-3.*
331. Davidson, T.M., S.E. Olitsky, and J.L. Wei, *Hereditary hemorrhagic telangiectasia/avastin. The Laryngoscope, 2010. 120: p. 432-435.*
332. Dougherty, P.M., J.P. Cata, J.V. Cordella, A. Burton, and H.-R. Weng, *Taxol-induced sensory disturbance is characterized by preferential impairment of myelinated fiber function in cancer patients. Pain, 2004. 109: p. 132-142.*
333. Pushkarev, V.M., D.V. Starenki, V.A. Saenko, H. Namba, J. Kurebayashi, M.D. Tronko, and S. Yamashita, *Molecular Mechanisms of the Effects of Low Concentrations of Taxol in Anaplastic Thyroid Cancer Cells. Endocrinology, 2004. 145: p. 3143-3152.*
334. Ibsen, S., E. Zahavy, W. Wrasdilo, M. Berns, M. Chan, and S. Esener, *A Novel Doxorubicin Prodrug with Controllable Photolysis Activation for Cancer Chemotherapy. Pharmaceutical Research, 2010. 27: p. 1848-1860.*
335. Broxterman, H.J., K.J. Gotink, and H.M.W. Verheul, *Understanding the causes of multidrug resistance in cancer: a comparison of doxorubicin and sunitinib. Drug Resistance Updates, 2009. 12: p. 114-126.*