

國立臺灣大學藥學專業學院藥學研究所

碩士論文

Graduate Institute of Pharmaceutical Sciences School of Pharmacy

National Taiwan University

Master Thesis



Collapsin response mediator protein-1 與穿胞胜肽接合體  
之製備及其於肺腺癌細胞之胞內運輸研究

Preparation of collapsing response mediator protein-1  
(CRMP-1) and cell-penetrating peptide conjugates and  
study on its intracellular delivery in lung  
adenocarcinoma cells

吳駿誼

Jyun-Yi Wu


指導教授：沈麗娟 博士

Advisor: Li-Jiuan Shen, Ph.D.

中華民國 104 年 1 月

January, 2015

## 誌謝



首先誠摯的感謝我的指導教授沈麗娟老師，謝謝沈老師在這兩年多以來的細心指導，記得剛入學時，我曾經對自己進入研究所感到迷惘，後來老師提到：「如果不能選你所愛，那就愛你所選擇的。」是這段話鼓勵我努力將碩士學位完成。在這兩年多的時間，實驗上遇到挫折時，沈老師的一句：「那就做吧！」就讓我對實驗充滿信心，沈老師也會關心我的生活起居，讓我感覺到縱使是一個人離鄉到臺北唸書，在實驗室也能感受到溫暖。

這本論文的完成，亦要感謝兩位口試委員，潘思樺老師與孔繁璐老師，兩位老師在細胞的相關實驗以及蛋白質的純化分別給予我適當建議，讓我的研究進行得更加順利；此外，也謝謝潘老師在未來職涯上給我的寶貴意見以及孔老師平日的關心。

接著要感謝的是明鋒學長，教導我的各項實驗技巧，學長對實驗處處講求完美的性格，是我在這兩年來的最佳榜樣，也特別感謝紫涵、文衡、曉軒幾位學長姐在實驗、專題報告方面及生活大小事的協助；感謝柏全將實驗室的管理非常好，讓我在最後的階段可以專心實驗不必分心；感謝明宏、少夫、廷宇、慧怡、佳慧、星羽你們幾位好同學、好夥伴，懷念一起吃飯、聊是非的日子了，水森館還依稀有著大家的笑聲。


謝謝宗芳總是聽我聊心事、抒發情緒，謝謝宜鈴跟凱君在最後寫論文這段時間的建議，謝謝珮綺陪著我到處吃吃喝喝，這段時間還真是增胖不少，謝謝捷凱和我一起 follow 美國職棒最新消息，你們的陪伴讓我這兩年多的研生活變得絢麗多彩。最後的感謝，獻給我摯愛的雙親，謝謝你們的照顧與鼓勵，對我做的決定總是支持到底，希望未來，我能夠成為你們的驕傲。



## 中文摘要

Collapsin response mediator protein-1 (CRMP-1) 是一種能促進神經細胞生長椎崩塌 (growth cone collapse) 及軸突誘導 (axonal guidance) 的蛋白質，CRMP-1 和癌細胞的侵襲能力也具有相關性。CL<sub>1-5</sub> 是具有高度侵襲能力的人類肺腺癌細胞，其細胞內 CRMP-1 的表現量較侵襲能力低的 CL<sub>1-0</sub> 少，以基因轉染 (gene transfection) 的方式增加 CL<sub>1-5</sub> 的 CRMP-1 表現量，可抑制其侵襲能力並減少絲狀偽足的產生。肝素結合凝血附着素 (heparin-binding haemagglutinin adhesin, HBHA) 是從結核桿菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) 中發現的蛋白質，其 C 端區域是與宿主肺部表皮細胞黏合的重要區段，此段結構主要是由兩個片段重覆排列而成：KKAAPA (R1) 和 KKAAAKK (R2)。過去我們發現以 1R1 + 2R2 方式組合而成的胜肽 HBHAc，能成功地攜帶重組精胺酸去亞胺酶 (recombinant arginine deiminase, rADI) 進入人類乳癌細胞 (MCF-7)。為了增加 CL<sub>1-5</sub> 內 CRMP-1 的量，本研究利用大腸桿菌 (*Escherichia coli*) 所製造出重組之 CRMP-1 (rCRMP-1)，以高通量篩選的方式尋找 rCRMP-1 的再摺疊條件，接著透過化學修飾接上 HBHAc，預期 rCRMP-1 能夠經由 HBHAc 的幫助進入到 CL<sub>1-5</sub>。

首先，我們利用 Ni-NTA 管柱以梯度沖提的方式將 rCRMP-1 從包涵體中純化出來，接著以高通量篩選的方式找出 rCRMP-1 摺疊的最佳條件，依此條件進行 rCRMP-1 的透析與再摺疊，透析完成後，將 rCRMP-1 標記上 FITC 及接上 HBHAc。細胞實驗部分，我們選擇 CL<sub>1-5</sub> 作為模式細胞株，以 SRB assay 及 MTT assay 測試 HBHAc-rCRMP-1 是否會影響 CL<sub>1-5</sub> 的存活率，接著，以流式細胞儀分析 HBHAc-CRMP-1 進入細胞的效率，確認 HBHAc-rCRMP-1 能有效地進入細胞後，再以 F-actin 染色試驗來評估 HBHA-rCRMP-1 的活性。



研究結果顯示，本研究的純化方法能成功地純化出高純度的 rCRMP-1，我們找出 50 mM Tris、0.1% 甘露醇 (pH 9.0) 為 rCRMP-1 再摺疊的最佳條件，透析完成後我們將 rCRMP-1 置換到 1X PBS (pH 9.0) 的環境下，並順利地將 rCRMP-1 標記 FITC 及接上 HBHAc，我們發現以「先接 HBHAc，再接 FITC」的順序反應，可使得 rCRMP-1 及 HBHAc-rCRMP-1 的螢光量較為一致。在細胞存活率部分，SRB assay 結果顯示 HBHAc-rCRMP-1 及 rCRMP-1 皆不會造成細胞毒性，但投予 HBHAc-rCRMP-1 會使得 CL<sub>1-5</sub> 的型態產生改變；而利用 MTT assay 會得到偽陽性的結果，無法準確評估細胞毒性。在細胞活性試驗的部分，我們投予不同劑量的 HBHAc-rCRMP-1 及 rCRMP-1，對 F-actin 進行螢光染色觀察，結果顯示 CL<sub>1-5</sub> 細胞投予 30 nM 和 100 nM 的 HBHAc-rCRMP-1 後，其細胞帶有絲狀偽足的比率有減少的趨勢。在細胞攝取實驗，以 EGFP 作為報導可觀察到 HBHAc 能有效地將 EGFP 送入 CL<sub>1-5</sub>，證明 HBHAc 在 CL<sub>1-5</sub> 具有遞送的功能；接著我們投予 300 nM 的 rCRMP-1 及 HBHAc-rCRMP-1，培養兩小時後，HBHAc-rCRMP-1 與 rCRMP-1 進入細胞的比率皆高於對照組 (p<0.05)，但兩者間的差異在統計上並不顯著；我們同樣投予 300 nM 的 HBHAc-rCRMP-1 與 rCRMP-1 至 MCF-7，HBHAc-rCRMP-1 進入細胞的比率約為 30%，rCRMP-1 的比率為 6%，然而我們需要更多的結果去確認 HBHAc-rCRMP-1 是否在 CL<sub>1-5</sub> 與 MCF-7 的細胞攝取有所差異。

本研究成功地純化出 rCRMP-1、找到 rCRMP-1 摺疊的適當條件，並且製備出 HBHAc-rCRMP-1 的接合體，但 PBS 的環境並不適於 rCRMP-1 的保存。HBHAc-rCRMP-1 會使 CL<sub>1-5</sub> 的型態產生改變並減少 CL<sub>1-5</sub> 細胞絲狀偽足的表現量，卻不會影響其細胞存活率。HBHAc 能成功地遞送 EGFP 及 rCRMP-1 到 CL<sub>1-5</sub> 細胞，且 HBHAc 遞送 rCRMP-1 的能力會因細胞株不同而有所差異。而我們因為 rCRMP-1 的來源有限，利用化學鍵結的方式結合穿胞胜肽與蛋白質雖是有效地蛋白質遞送

策略，但未來我們需要更多的結果去確認。



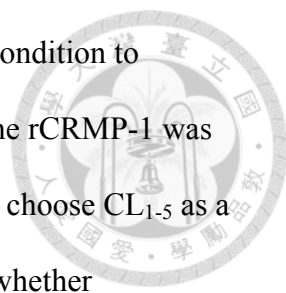
關鍵字：肝素結合凝血附著素、細胞穿透胜肽、蛋白質純化、CRMP-1、人類肺腺癌細胞



## Abstract

Collapsin response mediator protein-1 (CRMP-1) is a protein inducing growth cone collapse and axonal guidance of neural cells. It is also related to the invasive ability of cancer cells. CL<sub>1-5</sub> cells are human lung adenocarcinoma cells with highly invasive ability compared to CL<sub>1-0</sub> cells. The expression of CRMP-1 in CL<sub>1-5</sub> is lower than that in CL<sub>1-0</sub>. The increase of the expression of CRMP-1 in CL<sub>1-5</sub> by gene transfection inhibited invasive activity and reduced the formation of filopodia. Heparin-binding haemagglutinin adhesion (HBHA) is a protein discovered from *Mycobacterium tuberculosis*. Its C-terminal domain is an important part to adhere pulmonary epithelial cells of host, and this domain is composed of two repeated motifs : KKAAPA motif (R1) and KKAAAKK (R2). In our previous study, the peptide with the sequence of 1R1 +2R2 named HBHAc successfully carried recombinant arginine deiminase (rADI) into human breast cancer cells (MCF-7) intracellulately. In order to increase the intracellular amount of CRMP-1 in CL<sub>1-5</sub>, this study used the recombinant CRMP-1 (rCRMP-1) produced from *Escherichia coli* and found the best refolding condition of rCRMP-1 with a high-throughput screening method. The next, the rCRMP-1 was conjugated with HBHAc by chemical modification, and further confirmed the biological activity of HBHAc modified rCRMP-1 in CL<sub>1-5</sub>.

First, we used the nickel-nitrilotriacetic acid (Ni-NTA) column to purify rCRMP-1 from inclusion bodies with gradient elution. We found the best refolding



condition with a high-throughput screening method and chose this condition to dialyze and refold the rCRMP-1. After the completion of dialysis, the rCRMP-1 was labeled with FITC and linked with HBHAc. In cell experiments, we chose CL<sub>1-5</sub> as a model cell line, and used SRB assay and MTT assay to investigate whether HBHAc-rCRMP-1 affect the cell viability. We subsequently used flow cytometry to analyze the uptake efficiency of HBHAc-rCRMP-1, after confirming HBHAc-rCRMP-1 could effectively enter the cells, we evaluated the activity of HBHAc-rCRMP-1 by actin staining assay.

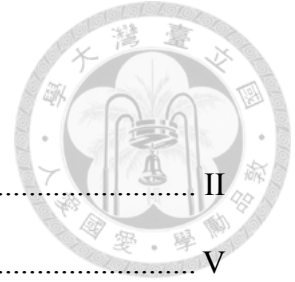
We obtained the rCRMP-1 from the inclusion bodies with a highly purity, we also found the best buffer (50 mM Tris, 0.1% mannitol, pH 9.0) condition for rCRMP-1 refolding. After dialysis, we changed the buffer into 1X PBS (pH 9.0) and rCRMP-1 was labeled with FITC and linked with HBHAc. In cell viability experiment, the SRB assay results showed both HBHAc-rCRMP-1 and rCRMP-1 didn't cause the cytotoxicity, but the cell morphology of CL<sub>1-5</sub> was changed after treating with HBHAc-rCRMP-1. In contrast, MTT assay showed a false-positive result because of some interference released from cells. In actin staining assay, we treated the cells with different dose of proteins, then we stained the F-actin to observe its distribution. The results showed the percentage of CL<sub>1-5</sub> cells with filopodia was reduced after treating with 30 nM and 100 nM of HBHAc-rCRMP-1. In cellular uptake study, we used enhanced green fluorescence protein (EGFP) as a reporter to observe the delivery ability of HBHAc, and HBHAc could carry EGFP into CL<sub>1-5</sub>. We further treated CL<sub>1-5</sub> with 300 nM of HBHAc-rCRMP-1 and rCRMP-1, after 2 hours incubation, the percentage of fluorescence positive cells of both treatment group was

higher than that of control group ( $p < 0.05$ ), but the differences between them were not statistically significant. We also treated MCF-7 with the same dose of proteins, the HBHAc-rCRMP-1 group showed 30% of fluorescence positive cells, but only 6% in rCRMP-1 group. However, we need further results to confirm that whether HBHAc-rCRMP-1 had different uptake efficiency in different cell lines.

In conclusion, we successfully purified the rCRMP-1, found the suitable condition for rCRMP-1 refolding, and prepared the HBHAc-rCRMP-1 conjugates. The PBS was not an appropriate buffer for rCRMP-1 preservation. HBHAc-rCRMP-1 changed the cell morphology and reduced the expression of filopodia in CL<sub>1-5</sub> cells, but not affected the cell viability. HBHAc had the ability to carry EGFP and rCRMP-1 into CL<sub>1-5</sub> cells, and HBHAc-rCRMP-1 showed different uptake efficiency in CL<sub>1-5</sub> and MCF-7 cells. However due to the limited availability of rCRMP-1, the conjugation of cell-penetrating peptides and proteins may be a useful protein delivery strategy, we need to confirm the results in the future.

Key words : heparin-binding haemagglutinin adhesin 、 cell-penetrating peptides 、 protein purification 、 collapsin response mediator protein-1 、 human lung adenocarcinoma





# 目錄

中文摘要 .....	II
Abstract.....	V
目錄 .....	VIII
圖目錄 .....	XI
表目錄 .....	XII
縮寫表 .....	XIII
第一章 緒論 .....	1
1.1 蛋白質藥物 .....	1
1.2 細胞穿透胜肽 (Cell-penetrating peptides , CPPs).....	2
1.3 細胞穿透胜肽的分類 .....	3
1.4 細胞穿透胜肽的應用與限制 .....	3
1.5 肝素結合凝血附著素 (Heparin-binding haemagglutinin adhesion , HBHA)....	4
1.6 Collapsin response mediator protein-1 (CRMP-1) .....	5
1.7 CRMP-1 於癌症轉移的研究 .....	6
第二章 研究目的 .....	8
第三章 實驗材料與方法 .....	9
3.1 實驗材料 .....	9
3.2 緩衝液配方 .....	12
3.3 蛋白質之純化與分析 .....	13
3.3.1 rCRMP-1 的純化 .....	13
3.3.2 rCRMP-1 再折疊條件之最佳化與透析 .....	14
3.3.3 蛋白質濃度測定 .....	15
3.3.4 蛋白質膠體電泳分析 .....	15



3.4 蛋白質修飾 .....	16
3.4.1 rCRMP-1 標記螢光素 FITC .....	16
3.4.2 蛋白質之化學性結合物製備 .....	17
3.5 細胞培養 .....	18
3.6 細胞存活率試驗 .....	18
3.6.1 SRB assay .....	19
3.6.2 MTT assay .....	19
3.6.3 細胞存活率計算 .....	19
3.7 rCRMP-1 之細胞活性試驗 (F-actin 染色試驗) .....	20
3.8 細胞攝取試驗 .....	20
3.9 統計分析 .....	21
第四章 實驗結果 .....	22
4.1 rCRMP-1 的純化與 HBHAc-rCRMP-1 的製備 .....	22
4.2 HBHAc-rCRMP-1 對 CL <sub>1-5</sub> 的細胞存活率分析 .....	24
4.3 HBHAc-rCRMP-1 對 actin 聚合之影響 .....	25
4.4 穿胞胜肽 HBHAc 於 CL <sub>1-5</sub> 細胞的細胞攝取試驗 .....	26
4.4.1 HBHAc-EGFP 進入 CL <sub>1-5</sub> 的效率分析 .....	26
4.4.2 HBHAc-rCRMP-1 進入 CL <sub>1-5</sub> 的效率分析 .....	27
4.4.3 HBHAc-rCRMP-1 進入 MCF-7 的效率分析 .....	28
第五章 討論 .....	29
5.1 CRMP-1 與 rCRMP-1 結構之差異 .....	29
5.2 rCRMP-1 再摺疊條件之最佳化 .....	30
5.3 HBHAc-rCRMP-1 對 CL <sub>1-5</sub> 無顯著的細胞毒性 .....	31
5.4 HBHAc-rCRMP-1 促使 MTT assay 產生偽陽性結果 .....	32
5.5 HBHAc-rCRMP-1 於 CL <sub>1-5</sub> 細胞的活性試驗 .....	33
5.6 HBHAc 於 CL <sub>1-5</sub> 細胞的蛋白質遞送之探討 .....	34

5.7 本研究之實驗限制 .....	35
第六章 結論 .....	36
參考文獻 .....	64





## 圖目錄

圖 1. Bicinchoninic acid (BCA) 作用原理圖 .....	38
圖 2. Fluorescein isothiocyanate (FITC) 與蛋白質反應示意圖 .....	39
圖 3. rCRMP-1 胺基酸序列 .....	40
圖 4. rCRMP-1 純化過程的膠體電泳分析 .....	41
圖 5. rCRMP-1 於不同型態之吸收光譜 .....	42
圖 6. rCRMP-1 於不同緩衝液中的吸光值 .....	43
圖 7. rCRMP-1 與 HBHAc 接合體之膠體電泳分析 .....	44
圖 8. HBHAc 與 FITC 接合順序對 FITC 螢光強度的影響 .....	45
圖 9. 不同濃度 HBHAc-rCRMP-1 對 CL <sub>1-5</sub> 細胞型態的影響 .....	46
圖 10. HBHAc-rCRMP-1 對 CL <sub>1-5</sub> 的細胞毒性試驗 (SRB assay) .....	47
圖 11. HBHAc-rCRMP-1 對 CL <sub>1-5</sub> 的細胞毒性試驗 (MTT assay) .....	48
圖 12. 含藥培養液對 MTT 試劑呈色之影響 .....	49
圖 13. 含藥培養液對 MTT 試劑吸光值之影響 .....	50
圖 14. rCRMP-1 與 HBHAc-rCRMP-1 投予 CL <sub>1-5</sub> 後的 actin 染色影像分析 .....	52
圖 15. 不同濃度 HBHAc-rCRMP-1 與 rCRMP-1 對 CL <sub>1-5</sub> 帶有絲狀偽足的比率之影響 .....	53
圖 16. HBHAc-EGFP 與 EGFP 於 CL <sub>1-5</sub> 的細胞攝取試驗分析 .....	55
圖 17. HBHAc-rCRMP-1 於 CL <sub>1-5</sub> 細胞的螢光訊號強度分析 .....	57
圖 18. HBHAc-rCRMP-1 於 MCF-7 細胞的螢光訊號強度分析 .....	59



## 表目錄

表 1. 細胞穿透胜肽分類表 (依胜肽來源分類) .....	60
表 2. HBHA 蛋白 C 端相關胜肽的資料 .....	61
表 3. 各 CRMP 的基因序列相似比率 (老鼠) .....	62
表 4. rCRMP-1 透析液及透析條件 .....	63

## 縮寫表



APS	ammonium persulfate
BSA	bovine serum albumin
CPPs	cell-penetrating peptides
CRMP-1	Collapsin response mediator protein-1
DMSO	dimethyl sulfoxide
EGFP	enhanced green fluorescence protein
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FBS	fetal bovine serum
HBHA	Heparin-binding haemagglutinin adhesin
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
MES	2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
Ni-NTA	nickel-nitrilotriacetic acid
PBS	phosphate buffered saline
SDS	sodium dodecyl sulfate
SPDP	N-succinimidyl 3-(2-pyridyldithio) propionate
SRB	sulforhodamine B
TEMED	tetramethylethylenediamine
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethane

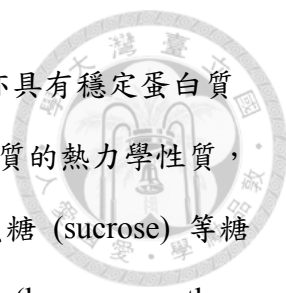


# 第一章 緒論

## 1.1 蛋白質藥物

蛋白質藥物可定義為治療人類疾病而從體外給予的蛋白質，目前多數的蛋白質藥物主要倚賴生物技術 (biotechnology) 而製造出的重組蛋白質 (recombinant proteins)，胰島素 (insulin) 是第一個被用於治療人類疾病的重組蛋白質藥物<sup>1</sup>，過去人們從牛或豬的胰臟組織萃取胰島素來治療第一型糖尿病 (Type I diabetes)<sup>2</sup>，不同動物的胰島素胺基酸序列與人類胰島素稍有差異，因此造成人類使用動物體萃取的胰島素會產生免疫反應<sup>3,4</sup>，隨著基因重組技術的發展，人們將人類胰島素基因送入細菌、真菌或哺乳類細胞使其表現，製造出重組人類胰島素<sup>5,6</sup>，此後基因重組技術日益成熟，亦使得蛋白質藥物迅速發展，除胰島素外，其他如臨床上使用的紅血球生成素 (erythropoietin, EPO)<sup>7</sup>、干擾素 (interferon, IFN)<sup>8</sup>、第八凝血因子 (clotting factor VIII)<sup>9</sup> 等皆是以此技術製造的重組蛋白質。

蛋白質的安定性是蛋白質製劑一個重要的問題，配製成溶液的蛋白質藥物，其易受到環境的影響而產生變質，如側鏈上天門冬胺酸 (asparagine, Asn) 的去胺化<sup>10</sup>、甲硫胺酸 (methionine, Met) 的氧化<sup>11</sup> 及胜肽鍵水解等化學安定性 (chemical stability) 的問題；不當的溶液條件亦會影響蛋白質的物理安定性 (physical stability)，產生沉澱或變性 (denaturation)<sup>12</sup>，這些變化皆可能導致蛋白質藥物的活性下降甚至失效，利用適當的緩衝液並添加不同的輔助劑，有助於維持蛋白質藥物的安定性，磷酸鹽 (phosphate) 帶有負電荷，能與蛋白質表面的正電荷形成離子鍵，增加蛋白質的熱穩定性 (thermal stability) 而穩定其結構<sup>13</sup>，Ruiz, L.等學者以 interferon-alpha (IFN- $\alpha$ ) 於不同的溶液中進行測試，發現檸檬酸鹽 (citrate) 也具有同樣的作用，且檸檬酸鹽的穩定能力更優於磷酸鹽<sup>14</sup>，其他如 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid (MES) 與三羥甲基氨基甲烷



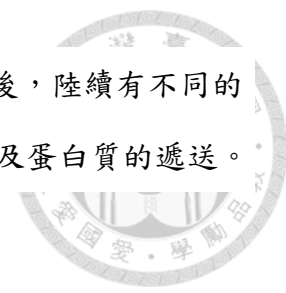
(tris(hydroxymethyl) aminomethane, Tris) 等帶有胺基的緩衝液亦具有穩定蛋白質結構的功能。蛋白質的安定性亦可藉由添加一些物質來改變蛋白質的熱力學性質，進而穩定其結構，如添加葡萄糖 (glucose)、乳糖 (lactose) 及蔗糖 (sucrose) 等糖類能穩定蛋白質結構<sup>15, 16</sup>；cyclodextrins 能夠改善人類生長激素 (human growth hormone, hGH) 溶解度，避免 hGH 產生聚集 (aggregation)<sup>17</sup>；polysorbates 等介面活性劑能夠減少蛋白質與水之間的張力，穩定蛋白質的結構<sup>18</sup>，每種蛋白質適用的緩衝液條件皆不相同，因此需進行測試以尋找最佳的保存條件。

除了安定性的問題之外，蛋白質能否有效的送達特定組織並進入細胞是更重要的課題，蛋白質藥物屬於大分子結構，細胞膜的磷脂雙層具有疏水性，是限制大分子進入細胞的主要屏障，為克服這個難題，目前已有相當多的藥物遞送載體被發展出來，並應用於蛋白質的遞送，包括微脂體 (liposome)、微胞 (micelles)、奈米顆粒 (nanoparticle)<sup>19, 20</sup> 等。

## 1.2 細胞穿透胜肽 (Cell-penetrating peptides, CPPs)

細胞穿透胜肽 (或稱穿胞胜肽) 是近 20 年來逐漸被發展的藥物遞送載體，一般是指胺基酸數目小於 30 個，能透過主動或被動運輸的方式穿透細胞膜的胜肽<sup>21</sup>，最早是由 Frankel, A.D. 等學者的研究發現人類免疫缺陷病毒 (Human immunodeficiency virus, HIV) 內的 Trans-Activator of Transcription (Tat) protein 能幫助病毒進入細胞，並且增加病毒的基因表現<sup>22</sup>，Green, M. 等學者更進一步地找出 Tat protein 的 region II (38-48) 與 region III (49-57) 是其具有細胞穿透活性的必要片段，最後是由 Vivès E. 等學者確立出 Tat 胜肽的序列 (GRKKRRQRRPPQ)<sup>23</sup>，此外，Joliot, A. 等學者亦發現黑腹果蠅 (*Drosophila melanogaster*) 的 Antennapedia homeodomain 具有進入到神經細胞的能力，接著由 Derossi, D. 等學者





確立出此細胞穿透活性片段，並將其命名為 Penetratin<sup>25,26</sup>。此後，陸續有不同的胜肽被研究及開發出來，並且應用於小分子藥物、DNA、RNA 以及蛋白質的遞送。

### 1.3 細胞穿透胜肽的分類

細胞穿透胜肽的分類方法依據其定義而有所不同<sup>27</sup>，第一種分類方法是依據穿胞胜肽的來源作分類（表 1），第一類是從具有細胞穿透活性的蛋白質所衍生的胜肽 (peptides derived from proteins)，如 Tat<sup>24</sup>、Penetratin<sup>26</sup> 以及由 cadherin 衍生而來的 pVEC<sup>28</sup> 皆是此類；第二類是嵌合胜肽 (chimeric peptides)，此類胜肽主要是結合兩種序列片段而成的胜肽，Transportan<sup>29</sup>、MPG<sup>30</sup> 以及 pep-1<sup>31</sup> 皆屬於此分類；第三類是合成胜肽 (synthetic peptides)，此類主要是從已知的穿胞胜肽活性結構進一步做設計，如 polyarginines<sup>32,33</sup>、MAP<sup>34</sup>、R<sub>6</sub>W<sub>3</sub><sup>35</sup> 等；第二種分類是依據穿胞胜肽的結構特性作區分，主要分成陽離子性胜肽 (cationic peptides)、兩性胜肽 (amphipathic peptides) 與疏水性胜肽 (hydrophilic peptides) 三種，陽離子性胜肽的結構主要富含離胺酸 (lysine, K) 與精胺酸 (arginine, R) 等陽離子胺基酸，如 Tat、poyarginine 與 ploylysine，兩性胜肽則包含了部分的親水與疏水的片段，其親水片段富含離胺酸，像是 Transportan 與 MAP，而疏水性胜肽在三種分類中，所佔的比例最少，此類胜肽其序列帶有正電荷的比率通常少於 20%<sup>27</sup>，Pept1 與 Pept2 屬於此分類<sup>36</sup>。

### 1.4 細胞穿透胜肽的應用與限制

自 1988 年至今，已經有超過 2000 篇的文獻與穿胞胜肽的研究相關，穿胞胜肽被廣泛應用於藥物遞輸，包含小分子藥物、DNA、RNA 以及蛋白質<sup>37</sup>，此外，亦有不少穿胞胜肽同時具有「遞送」與「治療」的雙重效果<sup>38</sup>。Heitz, F. 提出藥物遞輸的幾個重要原則，包含 (1) 於不同細胞有遞送效果；(2) 快速從核內體 (endosome) 釋放；(3) 能夠到達標的；(4) 低劑量即具有活性；(5) 無細胞毒性；

(6) 促進治療上的應用<sup>39</sup>。穿胞胜肽雖具有幫助藥物進入細胞的能力，但從這些原則上看，穿胞胜肽的使用仍具有一些限制，許多胜肽並沒有專一性，因此可能會將藥物遞送至正常組織細胞而產生毒性<sup>40</sup>；而 Koppelhus, U. 亦提出穿胞胜肽容易被分解，而造成其遞輸能力下降的原因<sup>41</sup>，儘管有這些限制，但穿胞胜肽在藥物遞輸上仍扮演重要的角色，目前也開發出更多的胜肽來突破這些限制。

## 1.5 肝素結合凝血附著素 (Heparin-binding haemagglutinin adhesion, HBHA)

肝素結合凝血附著素 (Heparin-binding haemagglutinin adhesion, HBHA) 是結核桿菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) 的表面抗原蛋白 (surface antigenic protein)，HBHA 被認為是結核桿菌黏附於宿主的肺部上皮細胞與肺外傳播的重要角色<sup>42-44</sup>。1996 年，Menozzi, F.D. 等學者為探討結核桿菌的致病機制而純化出 HBHA，分子量為 28 kDa，它會與硫酸化的糖類結合進而黏附於上皮細胞<sup>42</sup>。此後，陸續有研究進一步探討 HBHA 的結構特性，其結構主要可以分成三個主要的區段，一是接近 N 端的 transmembrane domain，共 18 個胺基酸；其次是由 81 個胺基酸組的  $\alpha$ -helical coiled-coil domain，此區段與 HBHA 間的聚集 (oligomerization) 有關；最後是位於 C 端的 glucosaminoglycan binding domain，此區段最主要負責與磷酸化糖類的結合<sup>44, 45</sup>。

HBHA 蛋白的 C 端富含離胺酸、脯胺酸 (Proline, P) 以及丙胺酸 (Alanine, A)，其主要是由 R1 (KKAAPA) 與 R2 (KKAAAKK) 兩個片段依 3R1 + 2R2 的順序排列而成<sup>46</sup>，過去本研究室利用 R1 及 R2 片段進行不同的組合，排列出 5 種不同的 HBHA 相關胜肽 (表 2)，以 A549 及 Caco-2 兩種細胞株進行細胞結合及攝取試驗，結果顯示 HBHA 蛋白 C 端的 glucosaminoglycan binding domain 在兩種細胞皆具有最高的結合與攝取能力，其次是 HBHAc 及 HBHAd；在穿胞試驗中，HBHAc

在 Caco-2 具有最佳的穿胞能力<sup>47</sup>。利用雙硫鍵結將 HBHAc 與重組精胺酸去亞胺酶 (recombinant arginine deiminase, rADI) 或細胞色素 c (cytochrome c) 結合，均能順利地將蛋白質送入癌細胞，並展現其藥理活性<sup>47,48</sup>；而利用重組技術製備出 HBHAc-rADI 與 HBHAc-EGFP fusion protein，同樣地分別能順利送入 MCF-7 與 HepG2 細胞<sup>49,50</sup>。

## 1.6 Collapsin response mediator protein-1 (CRMP-1)

Collapsin response mediator proteins (CRMPs) 是一類與神經系統發展相關的蛋白質，最早是由 Goshima, Y. 等學者於 1995 年發現，他們從雞的背根神經節 (dorsal root ganglion, DRG) 找出一段基因序列，其轉譯出的蛋白質分子量為 62 kDa，便將此命名為 CRMP-62；CRMP-62 與 UNC-33 具有相似的胺基酸序列 (61%)<sup>51</sup>，UNC-33 在線蟲的軸突生長及誘導 (axonal outgrowth and guidance) 扮演著重要的角色<sup>52</sup>，同樣地，CRMP-62 在 DRG 亦具有促進生長錐塌陷 (growth cone collapse) 的功能。至目前為止，共發現了 5 種 CRMPs (CRMP-1、CRMP-2、CRMP-3、CRMP-4、CRMP-5)，它們具有相近的分子量 (60-66 kDa)，其基因序列也具有高度的相似性 (表 3)<sup>53</sup>。

人類的 CRMP-1 於 1998 年被確定出來，它的序列與 dihydropyrimidinase (DHPase) 有相似的片段，因此被稱為 DHPase related protein-1 (DRP-1)，但 CRMP-1 本身並不具有 DHPase 的酵素活性<sup>54</sup>。CRMP-1 參與了 semaphorin 3A (Sema 3A) 途徑的訊息傳遞<sup>55</sup>，細胞膜上的 neuropilin-1 (NP-1) 與 plexin A1 (PlexA) 會結合形成複合體，影響 plexin A1 與 CRMP-1 的作用，當胞外的 Sema 3A 與 NP-1-PlexA1 結合，NP-1 對 PlexA1 的抑制作用會消失<sup>56</sup>，接著 PlexA1 會增加 cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5) 與 glycogen synthase kinase (GSK3 $\beta$ ) 對 CRMP-1 的磷酸化<sup>57</sup>，被磷酸化的 CRMP-1 會減少微管 (microtubules) 穩定性及影響肌動蛋白 (actin) 的聚合 (polymerization)<sup>58,59</sup>，進而顯示出 CRMP-1 軸突誘導及促使生長

錐崩塌的功能。

Deo, R.C.等學者以 X-ray 晶體繞射解析 CRMP-1 的結構，CRMP-1 的序列共有 572 個胺基酸，其折疊後的形狀近似於肺葉，並且形成四聚體 (tetramer) 的構型，第 1 至第 490 個胺基酸的部分是與 DHPase 相似的序列片段，但 CRMP-1 並不具有酵素活性，其結構前端由 7 個  $\beta$ -sheet 組成 (第 15 至第 69 個胺基酸)，後端為  $(\alpha/\beta)_8$  barrel 的結構 (第 70 至第 490 個胺基酸)<sup>56, 58</sup>；第 491 至第 572 個胺基酸的部分被認為是 CRMP-1 的活性片段，序列中 Tyr504、Thr509、Thr514、Ser518、Ser522 能被 Fyn、Cdk5、GSK3 $\beta$  等酵素磷酸化<sup>60, 61</sup>，被磷酸化的 CRMP-1 與微管的結合能力會降低，使得微管去聚合 (depolymerization)<sup>59, 62</sup>。

## 1.7 CRMP-1 於癌症轉移的研究

近年來，除了在神經發展與疾病的相關研究，CRMP-1 也被認為是一種腫瘤抑制基因 (tumor suppressor gene)<sup>63</sup>，它與腫瘤細胞的侵襲及轉移 (invasion and metastasis) 具有相關性。CL<sub>1</sub> 是由肺腺癌 (lung adenocarcinoma) 病人的腫瘤檢體所建立的細胞株<sup>64</sup>，依據它們的侵襲能力 (invasion ability) 分成數個次代 (CL<sub>1-0</sub>, CL<sub>1-1</sub>, CL<sub>1-2</sub>, CL<sub>1-3</sub>, CL<sub>1-4</sub>, CL<sub>1-5</sub> 與 CL<sub>1-5-F4</sub>)<sup>65</sup>，利用 cDNA microarray 篩選發現，具有高度侵襲能力的 CL<sub>1-5</sub> 與 CL<sub>1-5-F4</sub>，其 CRMP-1 的表現量相對於侵襲能力較弱的 CL<sub>1-0</sub> 較少，在肺癌病患的檢體分析中，也發現 CRMP-1 表現量與癌症分期、淋巴結轉移及存活率皆呈現負相關性<sup>66</sup>。目前發現在 CL<sub>1-5</sub> 細胞內的 NF- $\kappa$ B p50 表現量會增加，它會與 *CRMP-1* 的啟動子 (promoter) 結合，抑制 CRMP-1 的轉錄而造成 CRMP-1 在細胞的表現量減少<sup>67</sup>。因此若能夠增加癌症細胞內 CRMP-1 的表現量，可能是一個作為癌症輔助治療的方式，利用基因轉染 (gene transfection) 的方式，以 LipofectAMINE 包覆帶有 *CRMP-1* 的 plasmid，將 *CRMP-1* 送入 CL<sub>1-5</sub> 細胞後，能有效地增加 CL<sub>1-5</sub> 細胞內的 CRMP-1 表現量，相較於 mock-transfection 的組別，帶有 *CRMP-1* 的 CL<sub>1-5</sub> 其相對侵襲能力下降 40-60%，對 CL<sub>1-5</sub> 進行 F-actin 染

色來觀察其絲狀偽足 (filopodia) 的變化，也能夠見到絲狀偽足的數量明顯減少  
66。

除了利用基因轉染的方式，我們希望以投予 CRMP-1 的方式來增加 CL<sub>1-5</sub> 內的蛋白質表現量，為了克服蛋白質等大分子無法直接穿透細胞膜的問題，本研究欲以細胞穿透胜肽 HBHAc 結合 CRMP-1，預期 CRMP-1 能夠順利地進入 CL<sub>1-5</sub> 細胞，並且達到抑制 CL<sub>1-5</sub> 侵襲能力的效果。



## 第二章 研究目的

由於蛋白質不容易透過細胞膜的磷脂質雙層，本研究想利用一穿胞胜肽 HBHAc 來幫助 CRMP-1 遞送到細胞質，探討 CRMP-1 送入細胞後對於 CL<sub>1-5</sub> 的影響，同時利用 MCF-7 作為對照，探討兩種細胞株在細胞攝取上的差異。

為了達到這個目的，本研究由 *Escherichia coli* 製造出含有 recombinant CRMP-1 (rCRMP-1) 的包涵體 (inclusion body)，以親和層析法將 rCRMP-1 從包涵體中純化出來，並試圖尋找 rCRMP-1 純化、再摺疊以及蛋白質保存的最佳條件，接著透過化學修飾在 rCRMP-1 上的胺基接螢光標記 fluorescein isothiocyanate (FITC) 及 HBHAc，最後以 CL<sub>1-5</sub> 作為模式細胞，測試 HBHAc-rCRMP-1 的細胞攝取、細胞毒性及其蛋白質活性，本研究的階段性目標如下：

### 1. rCRMP-1 的製備與化學修飾：

- 建立 rCRMP-1 的純化方法。
- 找出 rCRMP-1 摺疊的最佳條件，將純化後的 rCRMP-1 進行再摺疊，恢復蛋白質活性。
- 利用化學結合的方式將 rCRMP-1 接上 FITC 及 HBHAc，以進行後續的細胞攝取試驗。

### 2 探討 HBHAc-rCRMP-1 對於肺腺癌細胞株的影響：

- 測試 HBHAc-rCRMP-1 對於 CL<sub>1-5</sub> 是否有毒性。
- 選定 CL<sub>1-5</sub> 及 MCF-7 作為測試細胞株，比較 rCRMP-1 與 HBHAc-rCRMP-1 在細胞攝取的差異。
- 測試 HBHAc-rCRMP-1 對 CL<sub>1-5</sub> 的 actin 聚合是否有影響

### 第三章 實驗材料與方法



#### 3.1 實驗材料

名稱	廠商	產地	實驗用途
Recombinant CRMP-1 (rCRMP-1)	怡發科技	Taiwan	蛋白質純化 (樣品)
DL-Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich <sup>®</sup>	India	蛋白質純化 (還原劑)
Hydrochloric acid, 37%	Merck <sup>®</sup>	Germany	蛋白質純化 (調整酸鹼值)
Imidazole	Acros <sup>®</sup>	USA	蛋白質純化 (沖提蛋白質)
2-propanol	景明化工	Taiwan	蛋白質純化
Nickel-nitrilotriacetic acid (Ni-NTA) agarose beads	Qiagen <sup>®</sup>	Germany	蛋白質純化
Sodium acetate	Merck <sup>®</sup>	Germany	蛋白質純化
Sodium chloride (NaCl)	Merck <sup>®</sup>	Germany	蛋白質純化 (緩衝液)
Sodium hydroxide (NaOH)	Bio Basic <sup>®</sup>	Canada	蛋白質純化 (調整酸鹼值)
Sodium phosphate, dibasic (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Merck <sup>®</sup>	Germany	蛋白質純化 (緩衝液)
Tris (hydroxymethyl) aminomethane (Tris)	Bio Basic <sup>®</sup>	Canada	蛋白質純化

Urea	Bio Basic <sup>®</sup>	Canada	蛋白質純化 (變性劑)
Mannitol	Sigma-Aldrich <sup>®</sup>	China	蛋白質純化 (再折疊輔助劑)
Micro BCA <sup>™</sup> Reagent kit	Thermo <sup>®</sup>	USA	蛋白質定量
Bovine serum albumin (BSA)	Sigma-Aldrich <sup>®</sup>	USA	蛋白質定量
AccuRuler RGB prestained protein ladder	Maetrogen <sup>®</sup>	USA	蛋白質膠體電泳 (Protein marker)
Acetic acid, Galacial	J.T. Baker <sup>®</sup>	USA	蛋白質膠體電泳
Acrylamide/Bis-acrylamide 40% solution (19:1)	Bio Basic <sup>®</sup>	Canada	蛋白質膠體電泳
Ammonium persulfate (APS)	Sigma-Aldrich <sup>®</sup>	USA	蛋白質膠體電泳
Ammonium sulfate, Granular ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ )	J.T. Baker <sup>®</sup>	USA	蛋白質膠體電泳
Bromophenol blue	Amersham Biosciences <sup>®</sup>	Sweden	蛋白質膠體電泳
Coomassie brilliant blue G-250	Nacalai tesque	Japan	蛋白質膠體電泳
Glycerin	Merck <sup>®</sup>	Germany	蛋白質膠體電泳
Glycine	Sigma-Aldrich <sup>®</sup>	USA	蛋白質膠體電泳
Methanol	Aencore <sup>®</sup>	Taiwan	蛋白質膠體電泳
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	USB <sup>®</sup>	England	蛋白質膠體電泳
N, N,N',N'-Tetramethylethylene diamine (TEMED)	Amersham Biosciences <sup>®</sup>	Sweden	蛋白質膠體電泳




Spectra/Pro <sup>®</sup> 4 membrane	Spectrum laboratories <sup>®</sup>	USA	透析
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Riedel-de Haen <sup>®</sup>	Germany	溶媒
Heparin-binding hemagglutinin adhesin c (HBHAc)	曜鴻生技	Taiwan	穿胞胜肽，與 rCRMP-1 結合，作為實驗組
N-succinimidyl-3-(2-pyridyl dimethylamino) propionate (SPDP)	Thermo <sup>®</sup>	USA	Cross-linker，連接 rCRMP-1 與 HBHAc
Fluorescein isothiocyanate (FITC)	Sigma-Aldrich <sup>®</sup>	USA	螢光標記
Dimethyl sulfoxide (DMSO) HYBRI-MAX <sup>®</sup>	Sigma-Aldrich <sup>®</sup>	USA	無菌，細胞抗凍劑
Fetal bovine albumin (FBS)	Biological Industries <sup>®</sup>	Israel	細胞培養
HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)	Sigma-Aldrich <sup>®</sup>	USA	細胞培養
Penicillin，10,000 units/mL / Streptomycin，10,000 μg/mL	HyClone <sup>®</sup>	USA	細胞培養
Potassium chloride (KCl)	Fluka <sup>®</sup>	Switzerland	細胞培養
Potassium phosphate, monobasic (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Sigma-Aldrich <sup>®</sup>	Japan	細胞培養
Roswell Park Memorial Institute-1640 (RPMI-1640)	GIBCO <sup>®</sup>	USA	細胞培養

Sodium bicarbonate (NaHCO <sub>3</sub> )	Sigma-Aldrich <sup>®</sup>	USA	細胞培養
Sodium pyruvate	HyClone <sup>®</sup>	USA	細胞培養
0.5% trypsin-EDTA	GIBCO <sup>®</sup>	USA	細胞培養
Acetic acid, Galacial	J.T. Baker <sup>®</sup>	USA	細胞存活率試驗
Trichloroacetic acid, Crystal	J.T. Baker <sup>®</sup>	USA	細胞存活率試驗
Sulforhodamine B (SRB)	Sigma-Aldrich <sup>®</sup>	USA	細胞存活率試驗
Thiazolyl Blue Tetrazolium Blue (MTT)	Sigma-Aldrich <sup>®</sup>	USA	細胞存活率試驗
Paraformaldehyde	林純藥工業	Japan	細胞活性測試
Potassium chloride (KCl)	Fluka	Switzerland	細胞活性測試
Potassium phosphate, monobasic (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Sigma-Aldrich <sup>®</sup>	Japan	細胞活性測試
Sodium chloride (NaCl)	MERCK	Germany	細胞活性測試
Sodium phosphate, dibasic (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	MERCK	Germany	細胞活性測試
Triton X-100	Sigma-Aldrich <sup>®</sup>	USA	細胞活性測試
AlexaFlour594-conjugated phalloidin 300U	Invitrogen <sup>®</sup>	USA	細胞活性測試
Hoechst 33258	ACROS	USA	細胞活性測試

### 3.2 緩衝液配方

- Buffer A : 100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、100 mM NaCl、8 M urea、1 mM DTT、10 mM imidazole，調整 pH 至 8.0。

- 
- Buffer B : 100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、100 mM NaCl、8 M urea、1 mM DTT、250 mM imidazole，調整 pH 至 8.0。
  - 10X running buffer : 250 mM Tris、1.92 M glycine、1% SDS。
  - 1X running buffer : 以去離子水稀釋成 1X running buffer，調整 pH 至 8.3。
  - Staining buffer : 0.05% Coomassie blue G-250、10% acetic acid、15% methanol、3% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub><sup>68</sup>。
  - 10X Phosphate buffered saline (10X PBS) : 1.37 M NaCl、100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、27 mM KCl、20 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>。
  - 1X Phosphate buffered saline (1X PBS) : 以去離子水稀釋成 1X PBS，並 pH 調整至 7.4。

### 3.3 蛋白質之純化與分析

本研究所使用的蛋白質是由怡發科技公司 (AdvPharma, Inc.) 所提供之 recombinant CRMP-1 (rCRMP-1)，形式為 *E. coli* 破菌後所取得的包涵體 (inclusion body)，溶於含有高濃度變性劑 (8 M 尿素) 的緩衝液中。

#### 3.3.1 rCRMP-1 的純化

本實驗所使用的原理為固定化金屬離子親合性層析法 (immobilized metal affinity chromatography)；rCRMP-1 帶有六個組胺酸 (histidine, H) 序列，其側鏈上的 imidazole 能夠與二價陽離子結合，先以含有低濃度 imidazole 的緩衝液去除未結合蛋白質，接著逐漸提升緩衝液 imidazole 的濃度，將目標 rCRMP-1 沖提出，達到親合性層析的效果。

首先，取適量的 Ni-NTA agarose beads 加入 rCRMP-1 溶液，在 4°C、30 rpm

條件下反應至隔天；接著將含有 Ni-NTA agarose beads 的 rCRMP-1 溶液裝填至乾淨的分離管柱，並收集流出液 (flow-through)；充填完成的管柱連接 AKTA Prime 進行沖提。先以 5 倍體積的 Buffer A 進行沖洗，去除未結合的蛋白質，接著逐漸增加 Buffer B 的比例進行梯度沖提，最後再以 100% Buffer B 沖洗管柱中未流出的蛋白質，純化過程中每 1 mL 沖提液收集成一管，完成後用 NanoDrop<sup>®</sup> Spectrophotometer 測量每一管的 OD280，將吸光值最高的幾管合併，儲存於 4°C 冰箱中。

### 3.3.2 rCRMP-1 再折疊條件之最佳化與透析

純化出來的 rCRMP-1 存在於含有 8 M 尿素的緩衝液中，因此蛋白質為變性 (denatured) 的狀態，利用梯度透析的方式逐步地除去尿素，可使得蛋白質逐漸地恢復成折疊狀態，為減少再折疊過程中產生沉澱，我們利用 high-throughput screening 的方式去尋找 rCRMP-1 透析的最佳條件<sup>69,70</sup>。

首先，取 1  $\mu$ L rCRMP-1 分別與 19  $\mu$ L 的 8M 尿素 (soluble form) 與 100% 異丙醇 (insoluble form) 混合均勻，接著以 NanoDrop<sup>®</sup> Spectrophotometer 測量 220-700 nm 的吸光值，將偵測波長與吸光值作圖，比較 soluble form 與 insoluble form 的吸光值，選出 high-throughput screening test 時欲使用的偵測波長。接著依 pH 值 (8.0、9.0、10.0)、緩衝液濃度 (50 mM 或 500 mM tris buffer)、輔助劑之添加與否 (0.1% mannitol) 配製 12 組緩衝液系統，每組緩衝液取 95  $\mu$ L 加到 96 孔盤，再加入 5  $\mu$ L 的 rCRMP-1 作為實驗組，同時各組緩衝液取 95  $\mu$ L 與 5  $\mu$ L Buffer B 混合作為空白對照組，混合均勻後依上述實驗所選擇之波長偵測吸光值，測量的儀器為 Beckman Coulter PARADIGM<sup>™</sup> Detection Platform，測得的實驗組吸光值扣除空白對照組吸光值後作圖，選擇吸光值最低的組別作為透析用緩衝液。

將合併完成的 rCRMP-1 放入透析袋 (Spectra/Pro<sup>®</sup> 4 membrane, MWCO: 12 -

14 kDa) 中進行透析，以梯度透析的方式逐步去除蛋白質液中的尿素及 imidazole，每段透析時間為 24 小時，中間更換 2 次緩衝液，透析完成後將蛋白質取出分裝，儲存於 4°C 冰箱中。



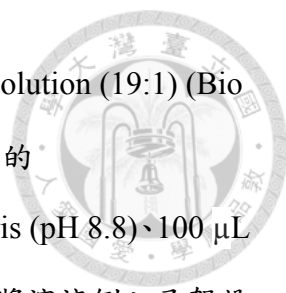
### 3.3.3 蛋白質濃度測定

Bicinchoninic acid assay (BCA assay) 是一個被廣泛用於蛋白質濃度的測定的方法<sup>71</sup>，其原理是蛋白質於鹼性環境下，可將二價銅離子 ( $\text{Cu}^{2+}$ ) 還原成一價的亞銅離子 ( $\text{Cu}^+$ )，而一分子的亞銅離子可與兩分子的 BCA 螯合產生藍紫色的水溶性產物 (圖 1)，此產物在 562 nm 的波長有最強的吸光值<sup>72</sup>，故以此方法所測得的樣品吸光值與標準品吸光值相比，即可推算得到相對應的蛋白質濃度。

配製蛋白質標準品 (bovine serum albumin, BSA)，濃度為 0、5、10、20、40、80  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (溶於去離子水)；接著配製 Micro BCA<sup>TM</sup> working reagent，依 25 : 24 : 1 的比例將 Micro BCA<sup>TM</sup> Reagent kit 中的 reagent A、B、C 混合均勻，將此試劑以等比例分別加入待測樣品及標準品，於 37°C 下反應 1 小時，反應結束後利用 Beckman Coulter PARADIGM<sup>TM</sup> Detection Platform 測量 OD562，將標準品的濃度與吸光值繪製成標準曲線後，將待測樣品的吸光值帶入標準曲線，即可計算出待測樣品的蛋白質濃度。

### 3.3.4 蛋白質膠體電泳分析

十二烷基硫酸鈉聚丙烯胺凝膠電泳法 (sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 是利用十二烷基硫酸鈉做為介面活性劑使蛋白質變性並包覆其蛋白質，使其帶有均勻性的負電荷，再進一步利用 DL-dithiothreitol (DTT) 將雙硫鍵還原，使帶負電荷的變性蛋白質在具有電場的聚丙烯胺凝膠中能依不同分子量進行分離，本研究利用此方法分析蛋白質純度以及 rCRMP-1 化學修飾的結果。



此實驗所使用的鑄膠試劑為 acrylamide/bis-acrylamide 40% solution (19:1) (Bio Basic<sup>®</sup>)。首先是配製分離膠體 (8%) (5.8 mL 的去離子水、2 mL 的 acrylamide/Bis-acrylamide 40% solution (19:1)、2.5 mL 的 1.5 M Tris (pH 8.8)、100  $\mu$ L 的 10% SDS 和 10% APS, 8  $\mu$ L 的 TEMED), 快速混合均勻後, 將溶液倒入已架設好的鑄膠台; 等待 40 分鐘後膠體凝固, 再配製集膠 (5%) (3.65 mL 的去離子水、625  $\mu$ L 的 acrylamide/Bis-acrylamide 40% solution (19:1)、625  $\mu$ L 的 1.0 M Tris (pH 6.8)、50  $\mu$ L 的 10% SDS 和 10% APS、5  $\mu$ L 的 TEMED), 混合均勻後, 將溶液倒入鑄膠台, 隨後插上樣本梳 (comb), 膠體凝固後移除樣品梳, 將膠體移至電泳槽, 加入適量的電泳緩衝液 (1X running buffer); 取適量的蛋白質樣品與 6X sample loading buffer 以 5:1 的比例混合均勻後, 以 95 $^{\circ}$ C 的乾浴加熱 10 分鐘, 待樣品冷卻後, 將樣品注入至樣品槽, 接著將電泳槽接上電源, 以 80 mV 的條件進行 40 分鐘, 待樣品跑至集膠與分離膠的交界面, 改變電壓至 120 mV 進行 120 分鐘; 跑膠結束後, 以 staining buffer 染色 1 小時, 再以去離子水清洗 3 次, 前兩次每次 10 分鐘, 最後一次清洗至隔天, 最後以 UVP 照膠系統進行膠體影像拍攝並進行封膠。電泳結果以軟體 Image J 計算分析 rCRMP-1 之純度。

### 3.4 蛋白質修飾

#### 3.4.1 rCRMP-1 標記螢光素 FITC

在鹼性的環境下, 蛋白質或胜肽的一級胺基會與螢光素 FITC (Flourescein isothiocyanate) 形成穩定的鍵結<sup>73</sup> (圖 2)。取適當濃度的 rCRMP-1 溶液 (保存於 1X PBS, pH 9.0), 利用 NanoDrop<sup>®</sup> Spectrophotometer 測量 OD<sub>280</sub>, 得下列公式中的  $E_{280}^{0.1\%}$ ; 接著配製 10 mM 的 FITC 溶液 (溶於無水 DMSO 中), 取出適量的 FITC 溶液緩慢地加入 rCRMP-1 (rCRMP-1 莫耳數: FITC 莫耳數 = 1:5); 於室溫且避光的條件下, 反應 6 小時。

將反應完成的液體放入透析袋中 (Spectra/Pro<sup>®</sup> 4 membrane, MWCO: 12 - 14 kDa) 進行透析, 透析液為 1X PBS (pH 9.0), 每 4 - 6 個小時換一次透析液, 共透析三次; 透析完畢後, 取成品 1.5  $\mu$ L 以 NanoDrop<sup>®</sup> Spectrophotometer 測量 OD280、OD495, 得到的數值帶入下列公式計算出取代度, 最後成品利用 Beckman Coulter PARADIGM<sup>™</sup> Detection Platform 測量樣品的螢光強度 (激發波長: 495 nm; 發散波長: 525 nm), 並裝入避光的微量離心管, 儲存於 4°C 冰箱中。

$$\text{Molar} \frac{F}{P} = \frac{MW}{389} \times \frac{A_{495}/195}{[A_{280} - (0.35 \times A_{495})] / E_{280}^{0.1\%}}$$

(MW 為被標記蛋白質的分子量; 389 為 FITC 分子量; 195 為 FITC 在 pH 13.0 下, 其 490 nm 的吸光係數; (0.35 x A<sub>495</sub>) 為 FITC 在 280 nm 的校正係數; E<sub>280</sub><sup>0.1%</sup> 是 1 mg/mL 蛋白質的吸光值<sup>74</sup>)

### 3.4.2 蛋白質之化學性結合物製備

N-succinimidyl 3-(2-pyridyldithio)propionate (SPDP) 是一個帶有雙反應基團的化合物, 一端可與胺基反應形成穩定的醯胺鍵, 另一端可與硫醇基反應形成雙硫鍵, 利用此性質可將兩個蛋白質結合<sup>75</sup>。配製 20 mM SPDP 溶液 (溶於無水 DMSO 中) 及 10 mM DTT 溶液 (溶於 1 M Sodium acetate, pH 5.2), 接著, 取適量的蛋白質溶液與 SPDP 溶液反應 (rCRMP-1 莫耳數: SPDP 莫耳數 = 1:10), 於室溫且避光下, 反應 4 個小時; 將反應完成的液體放入透析袋中 (MWCO: 12 - 14 kDa) 進行透析, 透析液為 1X PBS (pH 9.0), 每 4 - 6 個小時換一次透析液, 共透析三次。成品以 pyridine-2-thione assay 計算蛋白質與 SPDP 的鍵結比例, 取適量的樣品分別與 DTT 和 PBS 等比例混合, 於室溫下反應 10 分鐘, 利用 NanoDrop<sup>®</sup> Spectrophotometer 測量 OD343, 將測得的數值帶入下列公式, 即可得 rCRMP-1 和 SPDP 的莫耳數比。

$$\text{Molar} \frac{\text{SPDP}}{\text{protein}} = \frac{\Delta A_{343}}{8080} \times \frac{\text{MW of protein}}{\text{Concentration of protein} \left( \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right)}$$



( $\Delta A_{343}$  為蛋白質加入 DTT 及 PBS 後在波長 343 nm 下的吸光值差值；8080 為 pyridine-2-thione 在 343 nm 的吸光係數)

加入 HBHAc 溶液 (rCRMP-1 莫耳數：HBHAc 莫耳數 = 1：5)，於室溫下反應，並持續偵測吸光值計算取代度，直到取代度達到與第一階段相同即可停止反應；將反應後成品放入透析袋中 (MWCO：12 - 14 kDa) 進行透析，透析液為 1X PBS (pH 9.0)，每 4 - 6 個小時換一次透析液，共透析三次；透析結束後將成品取出分裝，儲存於 4°C 冰箱中。

### 3.5 細胞培養

本研究選用 CL<sub>1-5</sub> 作為模式細胞株，在細胞攝取試驗以 MCF-7 作為對照細胞株，將 CL<sub>1-5</sub> 及 MCF-7 細胞分別培養於培養盤上，兩種細胞株皆使用含有 10% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)、100 U/mL 盤尼西林 (penicillin)、100 μg/mL 鏈黴素 (streptomycin)、1 mM 丙酮酸鈉 (sodium pyruvate)、15 mM HEPES 的 RPMI-1640 細胞培養液；細胞生長於 37°C，5% CO<sub>2</sub> 的恆溫培養箱中，用 0.05% (1X) 乙二胺四乙酸胰蛋白酶 (trypsin-EDTA) 切下細胞後，以 1：3 - 1：5 的比例進行繼代培養。

### 3.6 細胞存活率試驗

MTT assay 與 Sulforhodamine B (SRB) assay 是用於測定細胞存活率的方法，MTT 會被活細胞以胞吞作用 (endocytosis) 帶入細胞，接著被胞內的還原酵素轉變成水不溶性的紫色結晶，以適當溶媒溶解結晶後即可比較細胞存活率<sup>76</sup>；SRB 會與活細胞內的蛋白質結合產生結晶沉澱，再以鹼性溶液溶解結晶進行比色<sup>77</sup>，本研



究此利用這兩個方法來評估 HBHAc-rCRMP-1 是否會對細胞產生細胞毒性。



### 3.6.1 SRB assay

將 CL<sub>1-5</sub> 細胞以 10<sup>4</sup> cells/well 的密度培養於 96 孔盤，24 小時後移除舊培養液，分別投予 1、3、10、30、100 nM 的 HBHAc-rCRMP-1 及 rCRMP-1 (配製於含 10% 胎牛血清的新鮮培養基) 作為實驗組，同時投予 PBS (配製於含 10% 胎牛血清的新鮮培養基) 作為對照組，每組均為三重複，於 37°C 培養 24 小時後加入 Trichloroacetic acid 至終濃度 10%，室溫下反應 15 分鐘後移除培養液，加入 50 μL 0.4% (w/v) SRB (in 0.1% acetic acid) 進行染色 20 分鐘，加入 50 μL 0.1% acetic acid 退染三次，吸乾 well 內的液體後待完全晾乾，加入 100 μL/well 10 mM Tris 溶解結晶沉澱，以 Beckman Coulter PARADIGM™ Detection Platform 測量 OD515。

### 3.6.2 MTT assay

將 CL<sub>1-5</sub> 細胞以 10<sup>4</sup> cells/well 的密度培養於 96 孔盤，24 小時後移除舊培養液，分別投予 1、3、10、30、100 nM 的 HBHAc-rCRMP-1 及 rCRMP-1 (配製於含 10% 胎牛血清的新鮮培養基) 作為實驗組，同時投予 PBS (配製於含 10% 胎牛血清的新鮮培養基) 作為對照組，每組均為三重複，於 37°C 培養 24 小時後，加入 0.5% MTT 試劑於 37°C 反應 2 小時，反應完成後移除上清液，加入 200 μL 0.1 N HCl (in isopropanol) 溶解紫色結晶，以 Beckman Coulter PARADIGM™ Detection Platform 測量 OD570。

### 3.6.3 細胞存活率計算

細胞存活率的計算方式是先將每組吸光值扣除背景值，接著以對照組的吸光值作為 100%，實驗組的吸光值除以對照組的吸光值後，求得相對應的比例來評估實驗組的細胞存活率是否會與對照組有所差異。

$$\text{Cell viability (\%)} = \frac{\overline{A_{\text{test}}} - \overline{A_{\text{blank}}}}{\overline{A_{\text{control}}} - \overline{A_{\text{blank}}}} \times 100\%$$

( $\overline{A_{\text{test}}}$  為實驗組的吸光值平均， $\overline{A_{\text{control}}}$  為對照組的吸光值平均， $\overline{A_{\text{blank}}}$  為空白對照組的吸光值平均)




### 3.7 rCRMP-1 之細胞活性試驗 (F-actin 染色試驗)

將 CL<sub>1-5</sub> 細胞以  $2 \times 10^5$  cells/well 的密度培養於 12 孔盤，培養 24 小時後，分別投予 1、10、30、100 mM 的 HBHAc-rCRMP-1 及 rCRMP-1 作為實驗組，同時投予 PBS 作為對照組。隔天移除含藥物之培養液，以 1X PBS 清洗兩次；加入 3.7% paraformaldehyde 固定細胞 10 分鐘，以 1X PBS 清洗兩次；加入 0.1% Triton X-100 作用 10 分鐘，以 1X PBS 清洗兩次；接著加入 1:40 AlexaFlour594-conjugated phalloidin (以 1X PBS 稀釋) 進行 actin 染色，於 37°C 的溫度下培養 1 小時後，以 1X PBS 清洗兩次；加入 Hoechst 33258 (以無菌水配製) 至終濃度 1  $\mu\text{g/mL}$ ，反應 10 分鐘後，以 1X PBS 清洗兩次。觀察的儀器為國立臺灣大學藥學專業學院藥學系的 InCell Analyzer 2000，放大倍率為 40 倍。AlexaFlour594-conjugated phalloidin 的激發波長為 594 nm，放射光的接收波長為 617 nm；Hoechst 33258 的激發光波長為 345 nm，放射光的接收波長範圍為 478 nm。

### 3.8 細胞攝取試驗

將 CL<sub>1-5</sub> 細胞以  $2 \times 10^5$  cells/well 的密度培養於 24 孔盤，隔天移除舊培養液，投予實驗藥物 (配製於不含胎牛血清的新鮮培養基) 作為實驗組，同時投予 PBS (配製於不含胎牛血清的新鮮培養基) 作為對照組，每組均為三重複，在 37°C 的溫度下培養 2 小時後，移除上清液並用 1X PBS 清洗細胞兩次，每個 well 加入適量 0.05% (1X) trypsin-EDTA 於 37°C 下作用 5 分鐘，再加入適量的新鮮培養液將細胞沖下，收集至避光的微量離心管，於 4°C 下以 500 g 離心 5 分鐘後，小心的移除上



清液並加入冰的 1XPBS 將細胞打散並將細胞液轉移至 FACS tube，利用流式細胞儀 (Becton Dickinson FACS Calibur) 及軟體 (Becton Dickinson CellQuest program) 進行分析；實驗結果利用對照組別劃分 M1 (定義為 FITC 陰性區域)、M2 (定義為 FITC 陽性區域)，其他組別依據此 M1、M2 區域亦繪製 FITC 陰性或陽性區，再利用軟體中的 Histogram status 計算幾何平均數 (Geometric Mean)，代表每顆細胞的平均螢光強度，單位為任意單位 (Arbitrary unit, a.u.)。

### 3.9 統計分析

實驗結果以平均值  $\pm$  標準差 (Mean  $\pm$  Standard deviation) 表示，當  $p$  value  $<$  0.05 時，即視為統計上有顯著差異。以\*表示  $p < 0.05$ ，\*\*表示  $p < 0.01$ ，\*\*\*表示  $p < 0.001$ ，使用 SPSS 16.0 為統計分析工具。實驗為兩組比較時使用 student T-test；實驗為多組比較時使用 one-way ANOVA。



## 第四章 實驗結果

### 4.1 rCRMP-1 的純化與 HBHAc-rCRMP-1 的製備

經由 DNA 重組技術將 *CRMP-1* 接入 pET-22b (+) vector，重組完成的質體被送入 *E. coli* 產生出含有 recombinant CRMP-1 (rCRMP-1) 的包涵體 (inclusion body)，rCRMP-1 帶有 pelB leader 及 His<sub>6</sub> tag，整段序列共有 619 個胺基酸，其分子量為 67233.7 (圖 3)。首先將包涵體以含有 8 M 尿素之緩衝液溶解，接著利用 IMAC (immobilized metal affinity chromatography) 搭配梯度沖提的方式，將 rCRMP-1 從包涵體中純化出來，從膠體電泳分析可見到隨著純化過程推展，rCRMP-1 有逐漸集中的趨勢 (圖 4)，蛋白質的位置介於 63 kDa 到 75 kDa 之間 (以 protein marker 作為對照)，符合 rCRMP-1 之分子量，可確認 rCRMP-1 被純化出來，並利用軟體 Image J 分析 lane 5 可得到 rCRMP-1 純度為 83.2%。

純化出的 rCRMP-1 溶液因處於 8 M 尿素的緩衝液而處於變性狀態 (denatured form)，要使 rCRMP-1 再折疊成活性狀態，我們以梯度透析的方式逐步去除緩衝液中的尿素。為了尋找最佳的透析條件，首先分別測量溶解態與未溶解態 rCRMP-1 在 220-700 nm 的吸光值，作圖後找出溶解態無吸光值但未溶解態具有明顯吸光值的位置，設定此 450 nm 為 high-throughput screening test 用的波長 (圖 5)，接著依 pH 值 (8.0、9.0、10.0)、緩衝液濃度 (50 mM 或 500 mM tris buffer)、輔助劑之添加與否 (0.1% mannitol) 分成 12 組緩衝液系統，各組緩衝液取 95  $\mu$ L 與 5 $\mu$ L 的 rCRMP-1 混合作為實驗組，並且以相同比例將各組緩衝液與 Buffer B 混合作為對照組，混合均勻後偵測 OD 450，測得的實驗組吸光值扣除空白對照組吸光值後作圖，結果顯示 500 mM Tris (pH 10.0) 具有最低的吸光值 (圖 6)，代表蛋白質在此緩衝液條件下具有較少的蛋白質沉澱，但考慮到蛋白質在高濃度離子與高 pH 值環境的安定性，我們選擇吸光值次低的 50 mM Tris，0.1 % mannitol (pH 9.0) 作為透



析用的緩衝液，透析過程中並未見到蛋白質沉澱析出。純化完成後，利用下列公式計算出產率為 39.55%。

$$Yield (\%) = \frac{Volume_{crmp} \times Conc_{crmp} \times purity}{Volume_i \times Conc_i \times 36.58\%}$$

$Volume_{crmp}$ ：純化完成後所得到 rCRMP-1 之總體積。

$Conc_{crmp}$ ：純化完成後所得到 rCRMP-1 之蛋白質濃度。

$Volume_i$ ：包涵體之總體積。

$Conc_i$ ：包涵體之蛋白質濃度。

36.58%：rCRMP-1 在 inclusion bodies 中佔有之百分比。

過去文獻顯示，Tris buffer 會干擾 SPDP 與蛋白質胺基的接合反應<sup>75</sup>，為了順利進行 rCRMP-1 與 HBHAc 及 FITC 的接合反應，我們將緩衝液變更為 1X PBS (pH 9.0)，過程並未見到蛋白質沉澱析出，置換完成後將 rCRMP-1 與 SPDP 以 1：5 比率反應 4 小時，反應完成後以 pyridine-2-thione assay 計算結合比為 2.91 (SPDP/CRMP-1)，然後再以相同比率加入 HBHAc 反應 30 分鐘，完成後計算結合比率為 1.83 (HBHAc/rCRMP-1)，代表 1 分子 rCRMP-1 平均接上 1-2 個 HBHAc，利用膠體電泳分析蛋白質成品，rCRMP-1 因接上 HBHAc 而往高分子量處的位移，位移幅度約為 2 kDa (圖 7)。接著我們探討 HBHAc 與 FITC 反應順序對螢光強度的影響，結果顯示將 rCRMP-1 先接上 FITC 再接 HBHAc，HBHAc-rCRMP-1 的 specific fluorescence intensity 為 rCRMP-1 的 17.63%；而 rCRMP-1 先接 HBHAc 再接 FITC，HBHAc-rCRMP-1 的 specific fluorescence intensity 為 rCRMP-1 的 69.22% (圖 8)。不管是哪一種反應順序，HBHAc 的接合會影響 FITC 的螢光強度，但是先接 HBHAc 再接上 FITC 的順序對螢光強度的影響較小，因此我們選擇先接 HBHAc 再接 FITC 來進行 FITC-HBHAc-rCRMP-1 的製備，因製備批次的不同，我們所製備出的 HBHAc-rCRMP-1 與 rCRMP-1 的 specific fluorescence intensity 的比率介於 70%至

90%之間。

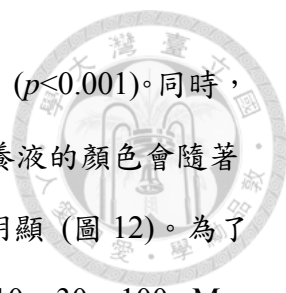


綜合以上結果證實我們成功地運用 Ni-NTA 純化系統將 rCRMP-1 純化出來，純化出的 rCRMP-1 具有相當高的純度，接著透過化學修飾的方式順利地將 HBHAc 接在 rCRMP-1 上。

## 4.2 HBHAc-rCRMP-1 對 CL<sub>1-5</sub> 的細胞存活率分析

為了瞭解 HBHAc-rCRMP-1 與 rCRMP-1 是否對 CL<sub>1-5</sub> 細胞產生毒性，我們投予 1、3、10、30、100 nM 的 HBHAc-rCRMP-1 與 rCRMP-1 至 CL<sub>1-5</sub> 細胞，並投予 1X PBS 作為對照組 (control)，接著利用 SRB assay 進行細胞存活率分析。給藥 24 小時後，顯微鏡觀察發現其細胞型態隨著給藥劑量增加，逐漸由紡錘狀轉變成圓形，而且此現象在 HBHAc-rCRMP-1 組別更為明顯 (圖 9)；SRB assay 的實驗結果顯示，投予 1、3、10、30、100 nM HBHAc-rCRMP-1，其相對於對照組的相對細胞存活率分別為 102.52±2.78%、97.95±2.91%、104.27±3.77%、102.68±0.24%、105.4±0.91%；而投予 1、3、10、30、100 nM rCRMP-1 的相對細胞存活率分別為 99.29±5.49%、100.03±2.62%、102.21±3.42%、102.23±2.61%、100.72±2.44% (圖 10)，不管是投予不同濃度 HBHAc-rCRMP-1 或不同濃度 rCRMP-1 之組別，其相對存活率與對照組均無統計上的差異，因此我們的實驗結果證實投予 100 nM 以內的 HBHAc-rCRMP-1 並沒有顯著的細胞毒性，但是對 CL<sub>1-5</sub> 的細胞型態會產生變化。

我們另外以 MTT assay 進行細胞存活率分析，卻有不一致的結果，投予 1、3、10、30、100 nM HBHAc-rCRMP-1 的吸光值分別為 0.77±0.05、0.73±0.04、0.90±0.02、0.84±0.03、1.05±0.04；而投予 1、3、10、30、100 nM rCRMP-1 的吸光值分別為 0.59±0.02、0.62±0.08、0.66±0.04、0.72±0.01、0.81±0.06 (圖 11)，兩個投藥組的吸光值相較於對照組 (0.54±0.01) 皆有增加的趨勢 ( $p < 0.001$ )，而且 HBHAc-rCRMP-1



組別其增加的幅度較 rCRMP-1 組明顯，在統計上具有顯著的差異 ( $p < 0.001$ )。同時，我們發現投藥 24 小時後，將 MTT 試劑加入含藥培養液後，培養液的顏色會隨著濃度增加而逐漸變深，此現象在 HBHAc-rCRMP-1 之組別更為明顯 (圖 12)。為了排除蛋白質藥物對 MTT 試劑的干擾，我們投予投予 0、1、3、10、30、100 nM HBHAc-rCRMP-1 與 CRMP-1 至 CL<sub>1-5</sub> 細胞，同時投予 1、3 nM 的 HBHAc-rCRMP-1 與 CRMP-1 至不含 CL<sub>1-5</sub> 細胞的培養孔，24 小時後取出培養液，加入終濃度為 0.5 mg/mL 的 MTT 試劑，反應小時後偵測 570 nm 的吸光值。在已培養過細胞的含藥培養液部分，結果顯示投予 1、3、10、30、100 nM HBHAc-rCRMP-1 的組別，其培養液測得的吸光值分別為  $0.562 \pm 0.030$ 、 $0.628 \pm 0.054$ 、 $0.852 \pm 0.034$ 、 $0.999 \pm 0.088$ 、 $1.045 \pm 0.051$ ，投予 1、3、10、30、100 nM rCRMP-1 的組別，其培養液測得的吸光值分別為  $0.072 \pm 0.006$ 、 $0.079 \pm 0.002$ 、 $0.090 \pm 0.009$ 、 $0.125 \pm 0.005$ 、 $0.286 \pm 0.028$ ；在未培養過細胞的含藥培養液的部分，投予 1、3 nM HBHAc-rCRMP-1 的組別，其培養液測得的吸光值分別為  $0.096 \pm 0.009$ 、 $0.097 \pm 0.009$ ，投予 1、3 nM rCRMP-1 的組別，其培養液測得的吸光值分別為  $0.092 \pm 0.008$ 、 $0.090 \pm 0.007$  (圖 13)。綜合以上結果，我們對 CL<sub>1-5</sub> 投藥後，其培養液與 MTT 試劑反應會產生顏色變化，在 HBHAc-rCRMP-1 更為明顯，但是未培養過細胞的含藥培養液並無此變化，因此我們推測 HBHAc-rCRMP-1 可能會促使 CL<sub>1-5</sub> 釋放出具有還原性的物質，干擾 MTT 試劑的反應。

### 4.3 HBHAc-rCRMP-1 對 actin 聚合之影響

為了瞭解 HBHAc-rCRMP-1 進入 CL<sub>1-5</sub> 細胞後對 actin 的聚合 (polymerization) 是否產生影響，將 CL<sub>1-5</sub> 細胞培養於 12 孔盤，培養 24 小時後，分別投予 1、10、30、100 nM 的 HBHAc-rCRMP-1 及 rCRMP-1 作為實驗組，同時投予 PBS 作為對照組，24 小時後以倒立式顯微鏡觀察細胞型態變化，接著移除含藥培養液，依序以 3.7% paraformaldehyde 固定細胞 10 分鐘，以 0.1% Triton X-100 作用 10 分鐘增



加細胞膜通透性，接著加入 1 : 40 AlexaFlour 594-conjugated phalloidin 進行 actin 染色 1 小時，最後加入 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Hoechst 33258 至終濃度，反應 10 分鐘後，以 InCell Analyzer 2000 觀察螢光訊號。

以倒立式顯微鏡觀察細胞型態，投予 10、30、100 nM 的 HBHAc-rCRMP-1 會促使細胞型態轉變成圓形，此結果與細胞存活率試驗的細胞型態影像一致；從 actin 的螢光影像的結果顯示，投予不同濃度的 HBHAc-rCRMP-1 可看出 CL<sub>1-5</sub> 帶有絲狀偽足的細胞數有隨著劑量增加而減少的 (圖 14)，進一步計算每組影像中帶有絲狀偽足的細胞比率，投予 1、10、30、100 nM HBHAc-rCRMP-1 的組別，帶有絲狀偽足的細胞比率為 74.44 $\pm$ 3.85%、70.00 $\pm$ 6.67%、43.33 $\pm$ 3.33%、42.22 $\pm$ 1.92%；而投予 1、10、30、100 nM rCRMP-1 的組別，帶有絲狀偽足的細胞比率為 74.44 $\pm$ 1.92%、71.11 $\pm$ 5.09%、71.11 $\pm$ 1.92%、68.89 $\pm$ 5.09% (圖 15)，實驗結果看出投予 30、100 nM 的 HBHAc-rCRMP-1，會使得 CL<sub>1-5</sub> 細胞帶有絲狀偽足的百分比下降約 30%，統計上具有顯著的差異 ( $p < 0.001$ )。

#### 4.4 穿胞胜肽 HBHAc 於 CL<sub>1-5</sub> 細胞的細胞攝取試驗

##### 4.4.1 HBHAc-EGFP 進入 CL<sub>1-5</sub> 的效率分析

過去，本研究室已成功利用 HBHAc 結合重組蛋白 ADI (Arginine deiminase)，將蛋白質送入 MCF-7 細胞<sup>50</sup>；也成功地製造出重組蛋白 HBHAc-EGFP，並確認其於 HepG2 細胞的胞內運輸作用及機制<sup>49</sup>，為了確認 HBHAc 在 CL<sub>1-5</sub> 也具有胞內運輸的效果，我們以 HBHAc-EGFP fusion protein 在 CL<sub>1-5</sub> 進行細胞攝取試驗，投予不同濃度的 HBHAc-EGFP 與 EGFP 至 CL<sub>1-5</sub> 細胞，於 37°C 培養 2 小時後以 0.25% trypsin-EDTA 去除附著於細胞表面的蛋白質，將細胞收集起來以流式細胞儀分析 HBHAc-EGFP 與 EGFP 之螢光訊號。

實驗結果顯示，投予 0.5、1、2.5、5、10  $\mu\text{M}$  HBHAc-EGFP 的組別，其單顆





細胞帶有的平均螢光強度為  $3.61\pm 0.25$ 、 $4.14\pm 0.27$ 、 $5.72\pm 0.61$ 、 $6.81\pm 0.40$ 、 $13.34\pm 3.94$ ，細胞帶有螢光訊號比率為  $6.42\pm 2.03\%$ 、 $10.42\pm 3.03\%$ 、 $16.85\pm 2.98\%$ 、 $31.62\pm 5.63\%$ 、 $63.42\pm 13.25\%$ ；而給予 0.5、1、2.5、5、10  $\mu\text{M}$  EGFP 的組別，其單顆細胞帶有的平均螢光強度分別為  $2.96\pm 0.05$ 、 $3.34\pm 0.03$ 、 $3.13\pm 0.1$ 、 $4.07\pm 1.00$ 、 $4.05\pm 0.18$ ，細胞帶有螢光訊號比率為  $1.76\pm 0.24\%$ 、 $2.72\pm 0.34\%$ 、 $1.94\pm 0.23\%$ 、 $4.53\pm 3.033\%$ 、 $5.29\pm 0.10\%$  (圖 16)，與對照組相比，HBHAc-EGFP 組別之單顆細胞平均螢光強度與細胞帶有螢光訊號比率皆有上升的趨勢，HBHAc-EGFP 與 EGFP 兩組間具有統計上的差異 ( $p<0.001$ )，實驗結果證實 HBHAc 確實能增加 EGFP 於 CL<sub>1-5</sub> 的細胞攝取，下一步我們要測試 HBHAc 是否能將 rCRMP-1 帶入 CL<sub>1-5</sub> 細胞。

#### 4.4.2 HBHAc-rCRMP-1 進入 CL<sub>1-5</sub> 的效率分析

為進行 HBHAc-rCRMP-1 於 CL<sub>1-5</sub> 的細胞攝取試驗，我們將 rCRMP-1 及 HBHAc-rCRMP-1 標記 FITC 作為螢光訊號，反應完成後依 3.4.1 之公式計算得到 F/P 值分別為 0.29 及 0.39。將 CL<sub>1-5</sub> 培養於 24 孔盤，隔天投予 300 nM 的 rCRMP-1 與 HBHAc-rCRMP-1 作為實驗組，並投予 1X PBS 作為對照組，於 37°C 培養 2 小時後，移除培養液並加入 0.25% trypsin-EDTA 去除附著於細胞表面的蛋白質，最後將細胞收集起來以流式細胞儀分析螢光訊號，HBHAc-rCRMP-1 與 rCRMP-1 之 specific fluorescence intensity 比值 (HBHAc-rCRMP-1/rCRMP-1) 為 0.901，實驗測的 HBHAc-rCRMP-1 組別之螢光強度除此數值作為校正。

實驗結果顯示，投予 HBHAc-rCRMP-1 的組別，其單顆細胞帶有的平均螢光強度為  $5.52\pm 0.09$ ，細胞帶有螢光訊號比率為  $10.08\pm 0.98\%$ ；而投予 rCRMP-1 的組別，其單顆細胞帶有的平均螢光強度分別為  $4.85\pm 0.08$ ，細胞帶有螢光訊號比率為  $8.35\pm 0.33$  (圖 17)。在單顆細胞帶有的平均螢光強度部分，HBHAc-rCRMP-1 與 rCRMP-1 相較於對照組 ( $2.87\pm 0.26$ )，皆具有統計上差異 ( $p<0.05$ )，HBHAc-rCRMP-1 組比起 rCRMP-1 組有更高的螢光強度 ( $p<0.05$ )；在細胞帶有螢

光訊號的比率的部份，HBHAc-rCRMP-1 與 rCRMP-1 相較於對照組 ( $0.82\pm 0.19$ )，兩組都具有統計上差異 ( $p<0.01$ )，HBHAc-rCRMP-1 組比起 rCRMP-1 組同樣地具有更高比率的細胞帶有螢光訊號 ( $p<0.05$ )。



#### 4.4.3 HBHAc-rCRMP-1 進入 MCF-7 的效率分析

將 MCF-7 培養於 24 孔盤，隔天投予 300 nM 的 rCRMP-1 與 HBHAc-rCRMP-1 作為實驗組，並投予 1X PBS 作為對照組，於 37°C 培養 2 小時後，移除培養液並加入 0.25% trypsin-EDTA 去除附著於細胞表面的蛋白質，最後將細胞收集起來以流式細胞儀分析螢光訊號，HBHAc-rCRMP-1 與 rCRMP-1 之 specific fluorescence intensity 比值 (HBHAc-rCRMP-1/rCRMP-1) 為 0.901，實驗測的 HBHAc-rCRMP-1 組別之螢光強度除此數值作為校正。

實驗結果顯示，投予 HBHAc-rCRMP-1 的組別，其單顆細胞帶有的平均螢光強度為  $7.38\pm 0.24$ ，細胞帶有螢光訊號比率為  $30.22\pm 3.08\%$ ；而投予 rCRMP-1 的組別，其單顆細胞帶有的平均螢光強度分別為  $4.51\pm 0.227$ ，細胞帶有螢光訊號比率為  $5.88\pm 0.22$  (圖 18)。在單顆細胞帶有的平均螢光強度部分，HBHAc-rCRMP-1 與 rCRMP-1 相較於對照組 ( $2.68\pm 0.16$ )，統計上皆具有相當顯著差異 ( $p<0.001$ )，HBHAc-rCRMP-1 組比起 rCRMP-1 組有更高的螢光強度 ( $p<0.001$ )；在細胞帶有螢光訊號的比率的部份，HBHAc-rCRMP-1 與 rCRMP-1 相較於對照組 ( $0.84\pm 0.15$ )，兩組都具有統計上差異 ( $p<0.01$ )，HBHAc-rCRMP-1 組比起 rCRMP-1 組同樣地具有更高比率的細胞帶有螢光訊號 ( $p<0.01$ )。



## 第五章 討論

### 5.1 CRMP-1 與 rCRMP-1 結構之差異

pelB leader 是一段含有 22 個胺基酸的胜肽片段，它是從伊文氏桿菌 (*Erwinia carotovora*) 中的 pectate lyase B 的 N 端被確立出來<sup>78</sup>，pelB leader 能夠將 *E. coli* 製造出的重組蛋白送到細菌的週質 (periplasm)，促進重組蛋白的摺疊<sup>79,80</sup>，摺疊完成的蛋白質會被運送到細菌的細胞質或被分泌到菌體外<sup>81</sup>。pET-22b (+) vector 是帶有 pelB leader 及 His<sub>6</sub> tag 序列的質體，利用 pET-22b (+) vector 可製造出帶有 pelB leader 及 His<sub>6</sub> tag 的重組蛋白，重組蛋白便能進一步利用 Ni-NTA column 進行蛋白質純化。本研究使用的蛋白質為怡發公司以 pET-22 (+) vector 所製造的 rCRMP-1，其序列 N 端帶有 pelB leader、C 端帶有 His<sub>6</sub> tag (圖 3)，rCRMP-1 雖然帶有 pelB leader，但製造出的蛋白質卻有 90% 以包涵體的形式存在，後續我們以 8M 尿素的緩衝液溶解包涵體，使蛋白質呈現變性狀態並完全溶解，接著進行 rCRMP-1 的純化與再摺疊。


Hill, J. 等學者將人類 cathepsin E 的 cDNA 接入 pET-22b (+) vector，讓 *E. coli* 製造出 recombinant cathepsin E，其酵素動力學特性與天然的 cathepsin E 相似<sup>82</sup>；Lu, H. 等學者亦利用 pET-22b (+) vector 製造出含有 recombinant dual human stem cell factor (rdhSCF) 的包涵體，此蛋白質帶有 pelB leader 與 His<sub>6</sub> tag，進一步純化與再折疊後得到具有活性的 rdhSCF<sup>79</sup>。而本研究對 CL<sub>1-5</sub> 細胞投予 HBHAc-rCRMP-1，在 100 nM 的濃度下會造成細胞型態的改變，綜合以上討論及結果，我們經由純化與再摺疊的步驟成功地從包涵體製備出 rCRMP-1，而得到的蛋白質亦具有活性。



## 5.2 rCRMP-1 再摺疊條件之最佳化

在蛋白質摺疊的過程中，蛋白質的結構會受到化學溶液、pH 值<sup>83</sup>、離子強度<sup>84</sup>、溫度<sup>85</sup>等因素影響，以動力學的觀點來看蛋白質摺疊，蛋白質的正確摺疊 (correct folding) 與聚集 (aggregation) 是相互競爭的狀態，變性蛋白質會迅速的產生中間產物 (intermediates)，進而轉變成復性蛋白 (nature protein) 或因聚集產生沉澱<sup>86</sup>，蛋白質的摺疊為一級反應，而蛋白質的聚集屬於二級反應 (或是更高級)<sup>85</sup>，也使得變性蛋白質大量轉變為中間產物時，容易發生聚集反應而產生沉澱，造成蛋白質的產率降低。為減緩蛋白質的聚集反應，可透過變更蛋白質的環境來達成，包含減低蛋白質濃度、改變化學溶液組成、pH 值或是添加輔助劑等等<sup>87</sup>，本研究參考 Vincentelli, R. 與 Dechavanne, V. 兩位學者之方法<sup>69,70</sup>，利用 high-throughput screening 的方式尋找 rCRMP-1 摺疊的最佳條件，我們依 pH 值、緩衝液離子強度及輔助劑的添加等條件分組進行測試。


蛋白質的 pH 值在等電點 (isoelectric point, pI) 時，淨電荷為零，蛋白質呈現電中性狀態，其溶解度也會降低，本研究使用之 rCRMP-1，其 pI 值為 6.77，過去有文獻以 PEM buffer (80 mM PIPES, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EGTA, pH 6.8) 作為透析液，於最終的步驟將 CRMP-1 置換至 pH 6.8 的環境<sup>59</sup>，但此緩衝液之 pH 值接近 rCRMP-1 的 pI 值，為避免 rCRMP-1 摺疊過程中產生沉澱析出，我們希望將 rCRMP-1 的淨電荷調整為正電或者是負電荷，此外，rCRMP-1 後續需進行接合反應 (SPDP 與 FITC)，此兩個化學接合反應在鹼性條件下有較佳的反應性<sup>73,75</sup>，綜合以上，最終我們選擇以鹼性的緩衝液進行測試 (pH 8.0、9.0、10.0)；Tris 與磷酸鹽 (phosphate) 緩衝液是蛋白質純化實驗常用的緩衝液系統<sup>88</sup>，Tris 的 pKa 值為 8.06，相較於磷酸鹽 (pKa 7.2)<sup>89</sup>，Tris 的緩衝範圍 (7.5-9.0) 較符合所需求的 pH 值，此外，Tris 與金屬離子具有輕微的親和性，能夠減少蛋白質上的胺基酸側鏈被氧化<sup>90</sup>，但磷酸緩衝液不僅防止氧化能力較弱，亦具有催化蛋白質去胺反應 (deamination)<sup>91,92</sup>，



考量到 pH 與蛋白質的安定性，我們選擇以 Tris 作為測試用的緩衝液；輔助劑的添加在蛋白質的再摺疊扮演了重要的角色，glycine、arginine<sup>93</sup>、sucrose<sup>94</sup>、mannitol<sup>95</sup> 等皆是常用的輔助劑，mannitol 被認為是一種 chemical chaperone，能夠幫助蛋白質正確的摺疊並減少聚集的產生<sup>96</sup>，mannitol 與 sorbitol 等物質屬於多元醇 (polyhydric alcohol)，它們能增加變性蛋白質的 preferential hydration，改變變性蛋白質與復性蛋白質間的自由能 (free energy, G)，使得復性蛋白質的穩定性增加，並增加蛋白質的溶解度<sup>97,98</sup>，因此我們添加 0.1% mannitol 作為輔助劑。實驗結果顯示 500 mM Tris (pH 10.0) 與 50 mM Tris、0.1% mannitol (pH 9.0) 這兩個緩衝液測試組具有較低的吸光值 (圖 6)，極度鹼性的 pH 值易造成蛋白質或者胜肽的斷鏈因此最終我們選擇 50 mM Tris、0.1% mannitol (pH 9.0) 作為緩衝液基底，並依表 4 的條件進行逐步透析，透析完成後，並未見到蛋白質沉澱析出。過去已有研究證實，緩衝液中含有胺基的物質 (如：Tris) 會影響 SPDP 的接合反應<sup>75</sup>，為順利進行接合實驗，我們將蛋白質置換到 1X PBS (pH 9.0) 的環境，卻發現置換後約一個月的時間，rCRMP-1 會逐漸產生沉澱，無法長時間穩定保存。

### 5.3 HBHAc-rCRMP-1 對 CL<sub>1-5</sub> 無顯著的細胞毒性

El-Andaloussi, S. 等學者利用不同的穿胞胜肽於不同的細胞株進行細胞毒性測試時發現，除了投藥時間與 CPPs 濃度的因素外，CPPs 的長度、攜帶藥物的類型與細胞種類都會影響 CPPs 對細胞的毒性<sup>99</sup>，過去本研究室對 Caco-2 與 A549 細胞投予 200 μM 的 HBHAc，皆沒有產生顯著的細胞毒性<sup>47</sup>，利用重組技術製造出 HBHAc 與 EGFP 的 fusion protein，投予 10 μM 至 HepG2 細胞也未產生細胞毒性<sup>49</sup>。本研究以 SRB assay 測試 HBHAc-rCRMP-1 的細胞存活率，結果顯示給投予 rCRMP-1 與 HBHAc-rCRMP-1，兩組的相對細胞存活率與對照組 (投予 PBS) 相比，統計上均無顯著差異 (圖 10)，此結果說明投予 100nM 以內的 HBHAc-rCRMP-1 對 CL<sub>1-5</sub> 不會產生細胞毒性。




HBHAc-rCRMP-1 對 CL<sub>1-5</sub> 雖然不會造成細胞毒性，但我們發現投予 30 nM 與 100 nM 會造成 CL<sub>1-5</sub> 的型態轉變成圓形，CL<sub>1-5</sub> 是一株侵襲能力較強的肺腺癌細胞株，其細胞型態多呈現紡錘狀，且細胞會長出絲狀偽足與板狀偽足 (lamellipodia)，過去利用基因轉染的方式增加細胞內 CRMP-1 的表現量，會改變 CL<sub>1-5</sub> 細胞型態且絲狀偽足的長度與數量也會減少<sup>65,66</sup>，我們投藥後亦觀察到細胞型態的改變，且此現象只在 HBHAc-rCRMP-1 觀察到，因此我們推測 rCRMP-1 透過 HBHAc 幫助，能順利地進入 CL<sub>1-5</sub> 細胞內，並使得 CL<sub>1-5</sub> 產生型態的改變，但此型態改變並不影響 CL<sub>1-5</sub> 的存活率。

#### 5.4 HBHAc-rCRMP-1 促使 MTT assay 產生偽陽性結果

本研究亦利用 MTT assay 測試細胞存活率，但卻與 SRB assay 的結果不一致 (圖 10、圖 11)，MTT assay 的結果顯示不論是 rCRMP-1 或是 HBHAc-rCRMP-1，兩組吸光值皆會隨著投藥劑量增加而上升，而且在 HBHAc-rCRMP-1 組更為明顯。目前我們已瞭解 CRMP-1 與癌細胞的侵襲能力有相關<sup>66</sup>，但 CRMP-1 對於 CL<sub>1-5</sub> 生長的促進並沒有相關的文獻探討。進一步從兩種實驗方法的原理探討，SRB assay 的原理是 SRB 與細胞的蛋白質結合產生沉澱，再以鹼性溶液溶解沉澱物，與對照組進行比色計算存活率<sup>100,101</sup>，但 SRB assay 的結果並不會受到已死亡的細胞干擾<sup>77</sup>；而 MTT assay 的原理則是 MTT 被活細胞攝入後，胞內粒質體的還原酵素會將 MTT 還原成紫色結晶，再以 DMSO 等溶媒將結晶溶解進行比色<sup>76</sup>，因此 MTT assay 的結果易受到具有還原能力的物質干擾，如 ascorbic acid<sup>102</sup>、genistein<sup>103</sup>、resveratrol<sup>104</sup> 等化合物，蛋白質中的半胱胺酸 (cysteine, C) 帶有硫醇基 (thiol group)，也會使 MTT 還原導致實驗結果呈現偽陽性 (false-positive)<sup>105</sup>。

我們在 MTT assay 的實驗過程中發現，已用於培養細胞後的含藥培養液會與 MTT 試劑反應，會使得上清液呈現紫色 (圖 12)，隨著給藥劑量增加，呈現的顏色

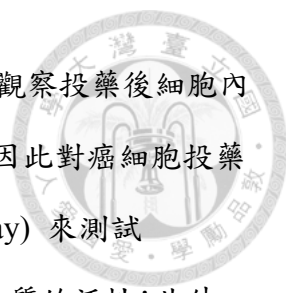


亦隨著加深；但我們將未用於培養細胞的新鮮含藥培養液 (1 nM、3 nM) 與 MTT 試劑混合並沒有產生此現象，其吸光值與對照組相比並無顯著的變化 (圖 13)，因此我們排除 HBHAc-rCRMP-1 會造成 MTT 還原的可能性，並推測 rCRMP-1 經由 HBHAc 幫助進入 CL<sub>1-5</sub> 細胞後，會促使細胞釋放具有還化能力的物質，進而導致 MTT 被還原產生偽陽性結果。

## 5.5 HBHAc-rCRMP-1 於 CL<sub>1-5</sub> 細胞的活性試驗

本研究以 F-actin 染色試驗測試 HBHAc-rCRMP-1 的蛋白質活性，F-actin 染色試驗是利用 phalloidin 去結合 F-actin，並利用 rhodamine 呈色觀察 F-actin 在細胞內的分布情形。利用基因轉染增加 CL<sub>1-5</sub> 胞內的 CRMP-1，透過 F-actin 染色可看到 CL<sub>1-5</sub> 細胞週邊產生絲狀偽足與板狀偽足 (lamellipodia)<sup>66</sup>，而利用計算絲狀偽足的長度、數量或是帶有絲狀偽足的細胞比率皆可以評估 CRMP-1 的於 CL<sub>1-5</sub> 細胞的活性。本研究的實驗結果發現投予 10、30、100 nM 的 HBHAc-rCRMP-1 會使 CL<sub>1-5</sub> 細胞的型態上從紡錘狀轉變成圓形，利用 F-actin 染色試驗觀察發現投予 30、100 nM 的 HBHAc-rCRMP-1 會使的帶有絲狀偽足的 CL<sub>1-5</sub> 細胞比率降低約 30%，但是在 rCRMP-1 投藥組並未見到此現象，這些實驗結果說明我們製備出的 HBHAc-rCRMP-1，經由純化、蛋白質再折疊以及化學修飾等步驟，仍具有其細胞活性。我們為得到更清晰的螢光影像，進行絲狀偽足數量的計算，我們重複進行 F-actin 染色試驗，但後續的實驗並未見到細胞型態變化，在 F-actin 螢光染色的部分也沒有觀察到帶有絲狀偽足的 CL<sub>1-5</sub> 細胞比率減少，我們後期的 F-actin 染色試驗的結果與初期的結果並不一致。

除了 F-actin 染色試驗的方法外，尚有許多方法可以進行 HBHAc-rCRMP-1 的活性評估。如：進行 G-actin 與 F-actin 的雙重染色，此方法原理與 F-actin 染色試驗相同，同時進行 G-actin/F-actin 的染色，計算出的 G-actin/F-actin 的螢光比率，




此比率代表 actin 在細胞內的聚合情形，利用此方法同樣地可以觀察投藥後細胞內 actin 的變化<sup>106</sup>；CRMP-1 與癌細胞的侵襲能力呈現負相關性，因此對癌細胞投藥後，利用 transwell plate 進行細胞侵襲試驗 (*In vitro* invasion assay) 來測試 HBHAc-rCRMP-1 對 CL<sub>1-5</sub> 侵襲能力的影響<sup>58</sup>，亦可用來評估蛋白質的活性；此外，CRMP-1 也能夠與微管 (microtubules) 結合並穩定其結構，利用表面電漿共振 (Surface plasmon resonance, SPR) 的方法可以測試 HBHAc-rCRMP-1 與微管結合的情形，評估 HBHAc-rCRMP-1 的蛋白質活性<sup>59</sup>。

綜合以上討論，我們利用 F-actin 染色試驗進行 HBHAc-rCRMP-1 的活性分析，但是前後得到的實驗結果並不一致，因此我們需要重複更多次的實驗去釐清這些差異，而我們亦可以利用上述的其他方式進行 HBHAc-rCRMP-1 的活性評估，但現階段我們因受限於材料不足，導致後續的實驗無法進行。

## 5.6 HBHAc 於 CL<sub>1-5</sub> 細胞的蛋白質遞送之探討

Enhanced green fluorescence protein (EGFP) 是藥物遞輸研究中常被用來作為報導 (reporter) 的一種蛋白質<sup>107</sup>，我們以 EGFP 觀察 HBHAc 於 CL<sub>1-5</sub> 的胞內運輸情況，在 2.5、5、10  $\mu\text{M}$  的濃度下，HBHAc-EGFP fusion protein 的螢光表現量及細胞帶有螢光訊號的比率皆高於 EGFP (圖 16)，證實 HBHAc 在 CL<sub>1-5</sub> 如同在 HepG2 具有進入細胞的效果，接著我們對 CL<sub>1-5</sub> 投予 300 nM 的 HBHAc-rCRMP-1 與 rCRMP-1，結果顯示 HBHAc-rCRMP-1 相較於對照組具有較高的細胞攝取 (圖 17)，與 rCRMP-1 相比差距並不大。比較這兩次的細胞攝取試驗，我們投予 HBHAc-EGFP 的最高濃度達 10 $\mu\text{M}$ ，HBHAc-rCRMP-1 的部分因為蛋白質量有限，我們最高投予 300 nM 的 HBHAc-rCRMP-1，因此蛋白質的劑量不足，可能是造成無法比較出 HBHAc-rCRMP-1 與 rCRMP-1 細胞攝取的差異之原因。此外，本研究所使用之 HBHAc-EGFP 是 fusion protein 的形式，而 HBHAc-rCRMP-1 是透過化學反應將





HBHAc 與 rCRMP-1 結合在一起，HBHAc 與 rCRMP-1 之間是以雙硫鍵連結在一起，結合前段 MTT 試驗結果的推論，HBHAc-rCRMP-1 會促使 CL1-5 細胞釋放出具還原性的物質，此物質亦有可能會造成 HBHAc 與 rCRMP-1 之間的鍵結斷開，進一步造成 HBHAc-rCRMP-1 的細胞攝取減少。

我們以另外一株細胞 MCF-7 進行細胞攝取試驗，同樣投予 300 nM 的 HBHAc-rCRMP-1 與 rCRMP-1，得到 HBHAc-rCRMP-1 的螢光表現量及細胞帶有螢光訊號的比率皆明顯高於 rCRMP-1 的結果 (圖 18)，過去 Koppelhus, U. 等學者曾發現有些穿胞胜肽在特殊情況下只有微量能夠進入細胞，像 Tat 胜肽無法進入乳癌細胞 (breast carcinoma cancer, SK-BR-3 cells)、淋巴細胞 (lymphoid cells, H9 cells) 和單核細胞 (monocytic cells, U937 cells)<sup>41</sup>，因此細胞株的不統可能造成不同的攝取結果。進一步探討，細胞的表面帶有許多蛋白多醣 (proteoglycans)，穿胞胜肽會與細胞表面的蛋白多醣產生交互作用，這些交互作用與穿胞胜肽的細胞穿透能力具有關聯性<sup>108, 109</sup>。HBHA 蛋白會與細胞表面的硫酸乙醯肝素 (heparin sulfate)，不同種類的細胞表現出硫酸乙醯肝素的量皆不相同<sup>110</sup>，若 CL<sub>1-5</sub> 與 MCF-7 細胞上硫酸乙醯肝素的表現量不同的話，它們在 HBHAc-rCRMP-1 細胞攝取上就可能會有所差異。

## 5.7 本研究之實驗限制

本研究利用化學反應將 rCRMP-1 與 HBHAc 結合在一起，我們無法精確控制每分子 rCRMP-1 接上的 HBHAc 數量，只能維持 HBHAc/rCRMP-1 比例介於 1 到 2 之間；同樣地，我們亦無法精確控制每分子 rCRMP-1 及 HBHAc-rCRMP-1 接上螢光的比率。



## 第六章 結論

本論文主要研究將 rCRMP-1 從包涵體中純化出來，尋找 rCRMP-1 摺疊復性的最佳條件，接著以 SPDP 做為連結，將 rCRMP-1 與細胞穿透胜肽 HBHAc 結合，並以 CL<sub>1-5</sub> 作為模式細胞株，測試 HBHAc-rCRMP-1 的細胞毒性、蛋白質活性及 HBHAc 遞送能力。結論敘述如下

1. 利用 Ni-NTA 的純化系統搭配梯度沖提的方式，順利地將 rCRMP-1 純化出來，得到 rCRMP-1 產率為 39.55%，純度為 83.2%。
2. 50 mM Tris、0.1% mannitol (pH 9.0) 的緩衝液條件可幫助 rCRMP-1 在透析摺疊的過程中無沉澱發生，但 Tris 會影響後續 rCRMP-1 與 HBHAc 的接合反應，最後將緩衝液條件更改為 1X PBS, pH 9.0，但此條件會使得 rCRMP-1 產生沉澱，無法長時間保存。
3. 利用化學修飾的方式，可順利將 rCRMP-1 及 HBHAc 連接起來，但兩者接合的順序會影響最終 FITC 的螢光強度，先接 HBHAc，再接 FITC，可使得 rCRMP-1 與 HBHAc-rCRMP-1 的螢光強度較為接近；若以先接 FITC，再接 HBHAc 的順序進行反應，兩者螢光強度會相差至 6 倍。
4. HBHAc-rCRMP-1 會造成 CL<sub>1-5</sub> 的細胞型態產生改變，但不影響細胞存活率 (依據 SRB assay 的結果)；而利用 MTT assay 並無法測出細胞真正的存活率，對 CL<sub>1-5</sub> 投予 HBHAc-rCRMP-1 後，可能會釋放具還原能力的物質與 MTT 反應，這是後續可探討之方向。
5. 我們利用 F-actin 染色試驗來評估 HBHAc-rCRMP-1 的活性，HBHAc-rCRMP-1 能減少 CL<sub>1-5</sub> 的絲狀偽足表現量，後續我們重覆此試驗，卻得到不一致的結果，我們需要進行更多的實驗去探討為何有此差異，我們亦可利用其他實驗方法來證實



HBHAc-rCRMP-1 的蛋白質活性。

6. 以 HBHAc 作為載體，能有效地將蛋白質 (EGFP 與 rCRMP-1) 遞送到 CL<sub>1-5</sub> 細胞；而分別給予相同劑量的 HBHAc-rCRMP-1 至 CL<sub>1-5</sub> 與 MCF-7 細胞，發現不同的細胞株會表現出不同的細胞攝取能力。

綜合以上，我們利用化學結合的方式將 HBHAc 與 rCRMP-1 連結在一起，成功地達到 HBHAc-rCRMP-1 於 CL<sub>1-5</sub> 的胞內遞送，儘管在 rCRMP-1 的活性確認及對 CL<sub>1-5</sub> 的影響需要更多的實驗證實，但利用化學反應將穿胞胜肽與蛋白質結合的方法是一個可運用的藥物遞送方式。

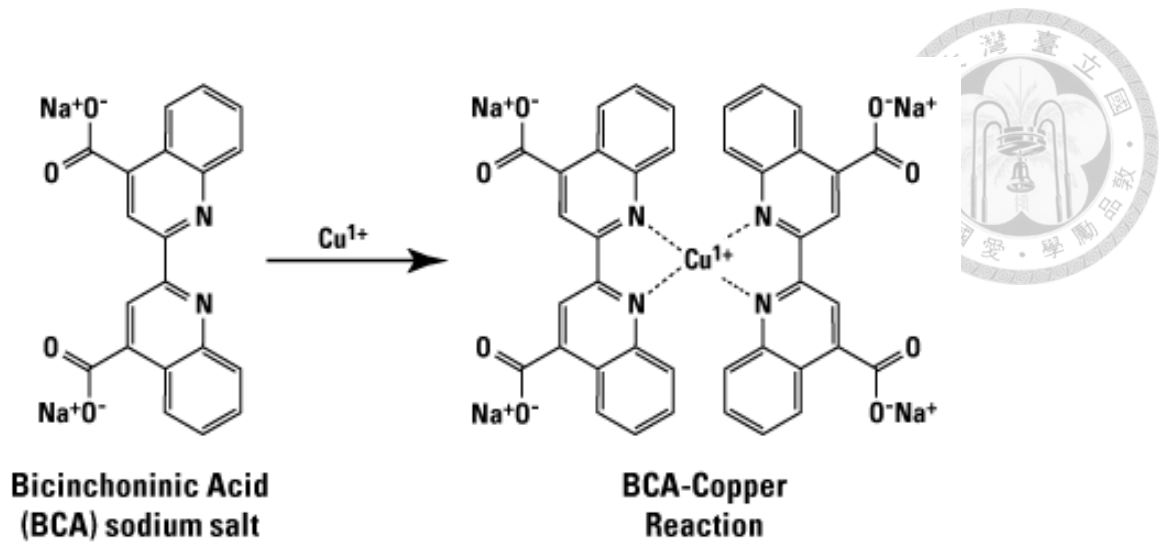


圖 1. Bicinchoninic acid (BCA) 作用原理圖

在鹼性環境下，蛋白質會將二價銅離子 ( $\text{Cu}^{2+}$ ) 還原形成一價銅離子 ( $\text{Cu}^+$ )，而一價銅離子 ( $\text{Cu}^+$ ) 會再與兩分子的 BCA 反應形成水溶性的產物，此產物在 562 nm 具有強吸光值，故可用於測量蛋白質濃度。

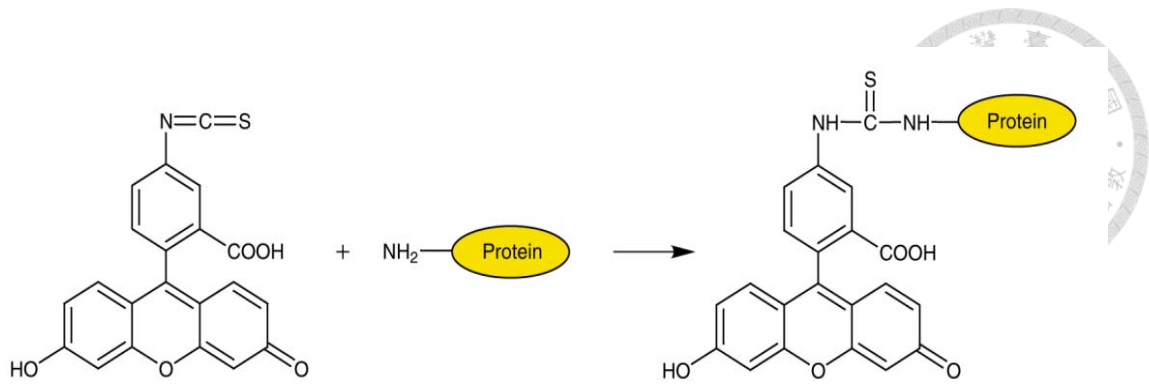



圖 2. Fluorescein isothiocyanate (FITC) 與蛋白質反應示意圖

FITC 的結構帶有異硫氰酸酯 (isothiocyanate)，其會與蛋白質上的胺基 (amino group) 反應形成穩定的鍵結。



MKYLLPTAAA GLLLLLAAQPA MAMDIGINS DPNSSVDKLM SYQGKKSIPH  
 ITSDRLLIKG GRIINDDQSL YADVYLEDGL IKQIGENLIV PGGVKTIKAN  
 GRMVIPGGID VNTYLQKPSQ GMTAADDFFQ GTRALVGGT TMIIDHVPE  
 PGSSLLTSFE KWHEAADTKS CCDYSLHVDI TSWYDGVREE LEVLVQDKGV  
 NSFQVYMAK DVYQMSDSQL YEAFYFLKGL GAVILVHAEN GDLIAQEQR  
 ILEMGITGPE GHALS RPEEL EAEAVFRAIT IAGRINCPVY ITKVMSKSA  
 DIIALARKKG PLVFGPIAA SLGTDGTHYW SKNWAKAAAF VTSPPLSPDP  
 TTPDYLTSL ACGLDQVTGS GHCPYSTAQK AVGKDNFTLI PEGVNGIEER  
 MTVVWDKAVA TGKMDENQFV AVTSTNAAKI FNLYPRKGRI AVGSDADVVI  
 WDPDKLKTIT AKSHKSAVEY NIFEGMECHG SPLVVISQ GK IVFEDGNIN  
 NKGMRGFIPR KAFPEHLYQR VKIRNKVFG L QGVS RGM YDG PVYEV PATPK  
 YATPAPSAKS SPSKHQPPPI RNLHQS N FSL SGAQIDDNNP RRTGHRIVAP  
 PGGRSNITSL GL~~E~~HHHHHH

圖 3. rCRMP-1 胺基酸序列

將 *CRMP-1* 接入 pET-22b(+) vector，利用 *E.coli* 產生之 recombinant CRMP-1，其蛋白質序列主要包含三個部分，包含 N 端的 pelB leader (綠色)、C 端的 His<sub>6</sub> tag (藍色) 以及完整的 CRMP-1 片段 (紅色)，全長共 619 個胺基酸，分子量為 67233.8。

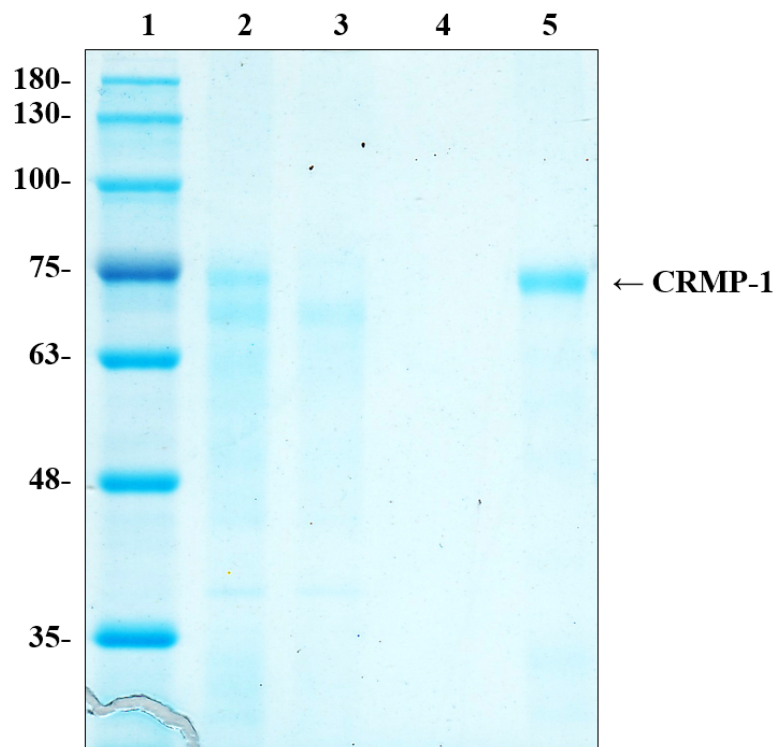


圖 4. rCRMP-1 純化過程的膠體電泳分析

利用 Ni-NTA column 進行 rCRMP-1 的純化，以 5 倍體積的 Buffer A 進行 column packing 及 washing，接著增加 Buffer B 的比例進行梯度沖提，梯度過程所用之緩衝液體積為 5 倍管柱體積，純化過程的每一段收集起來進行膠體電泳分析，並利用軟體 Image J 進行蛋白質純度分析。Lane 1: protein marker、Lane 2: inclusion bodies、Lane 3: flow-through、Lane 4: washing fraction、Lane 5: elution fraction。

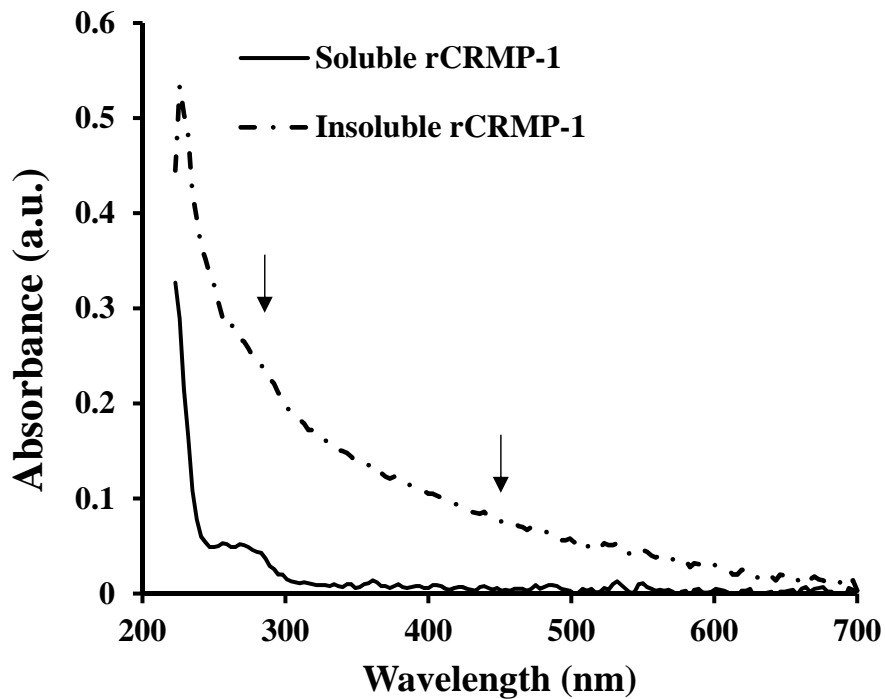


圖 5. rCRMP-1 於不同型態之吸收光譜

將已純化之 rCRMP-1 以 1:19 的比例稀釋於 8M 尿素 (soluble) 與 100% 異丙醇 (insoluble) 中，利用 8M 尿素稀釋可確保蛋白質為溶解態，混合均勻後，以 NanoDrop Spectrophotometer 測量 220 至 700 nm 之吸光值，測得的吸光值與偵測波長作圖，X 軸為偵測波長 (nm)，Y 軸為吸光值 (a.u.)，由左至右，圖上箭頭所示分別為 280 nm 與 450 nm 處。



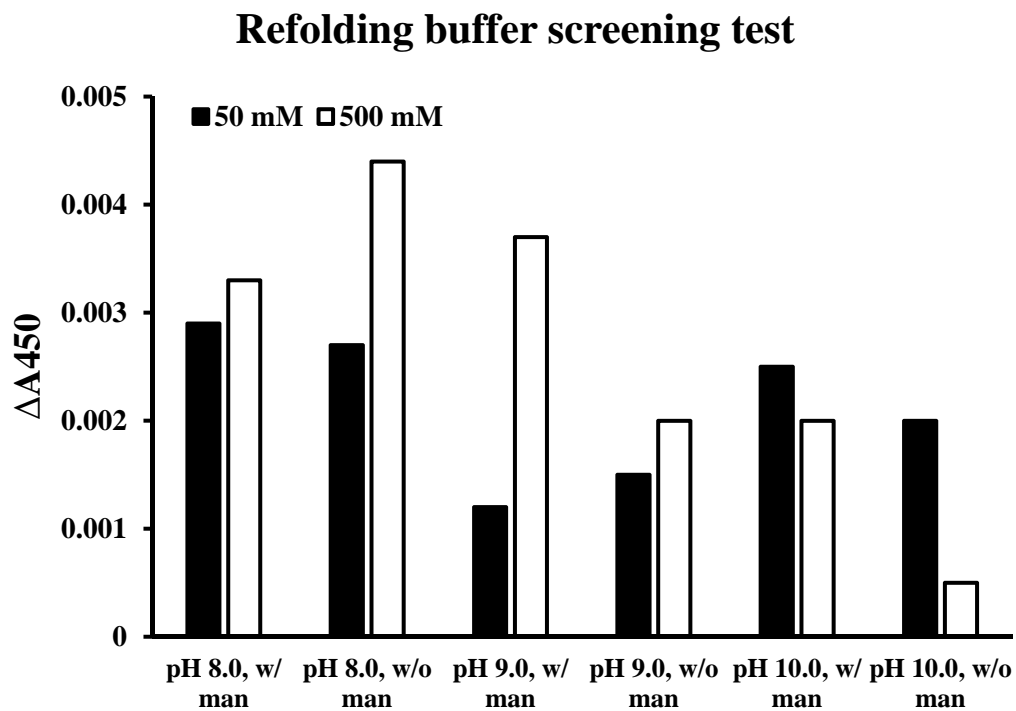


圖 6. rCRMP-1 於不同緩衝液中的吸光值

以 pH 值 (8.0、9.0、10.0)、Tris buffer 濃度 (50 mM、500 mM)、添加 0.1% mannitol (with or without) 分成 12 組緩衝液系統，每組緩衝液取 95  $\mu$ L 加至 96 孔盤，接著再加入 5  $\mu$ L rCRMP-1 溶液，同時各組緩衝液取 95  $\mu$ L 與 5  $\mu$ L Buffer B 混合作為空白對照組，測量 OD 450，測得的實驗組吸光值扣除對照組吸光值後作圖。

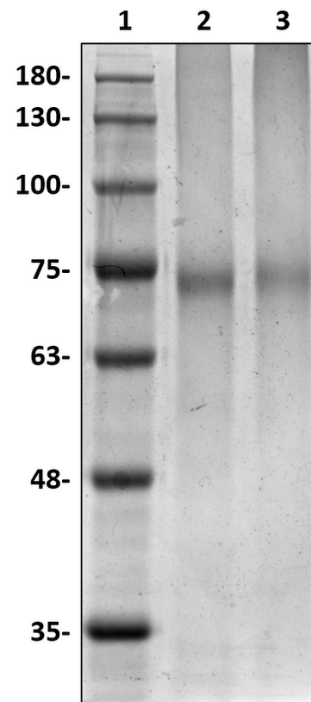


圖 7. rCRMP-1 與 HBHAc 接合體之膠體電泳分析

rCRMP-1 透過醯胺化反應 (Amidation) 與 SPDP 形成穩定的鍵結，接著 SPDP 在與 HBHAc 反應形成雙硫鍵，最終成品 HBHAc-rCRMP-1 與 rCRMP-1 進行膠體電泳分析，為避免雙硫鍵被切除，protein loading dye 未加入 1 mM DTT，HBHAc-rCRMP-1 相較於 rCRMP-1 有輕微地位移，位移幅度為 2 kDa。Lane 1：Protein marker，Lane 2：rCRMP-1，Lane 3：HBHAc-rCRMP-1。

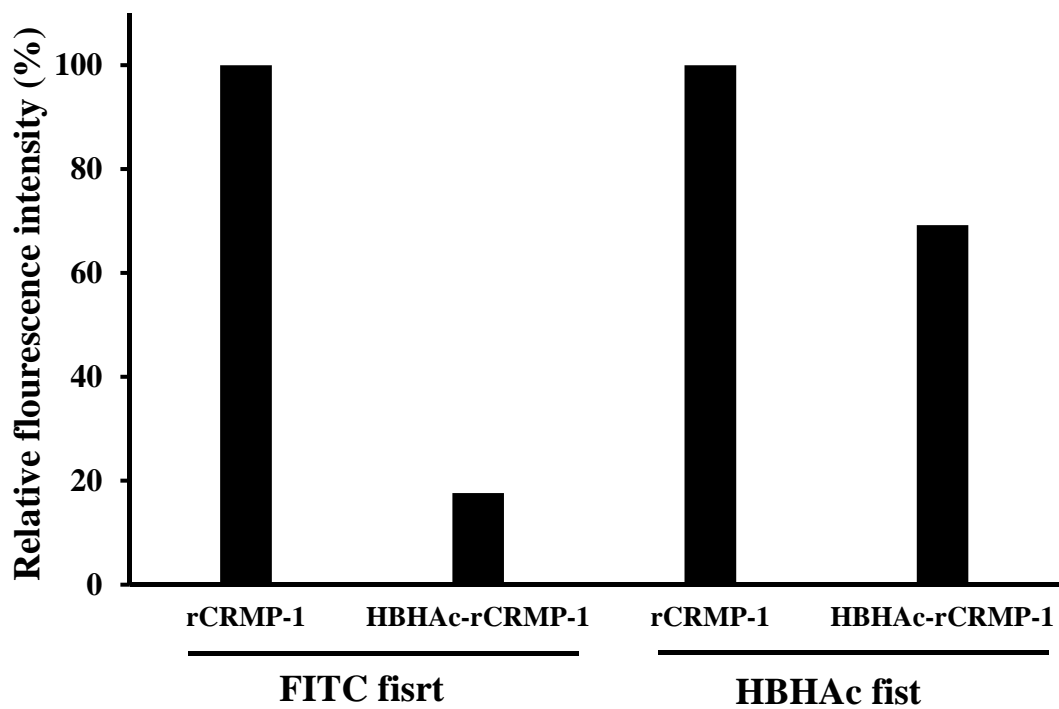
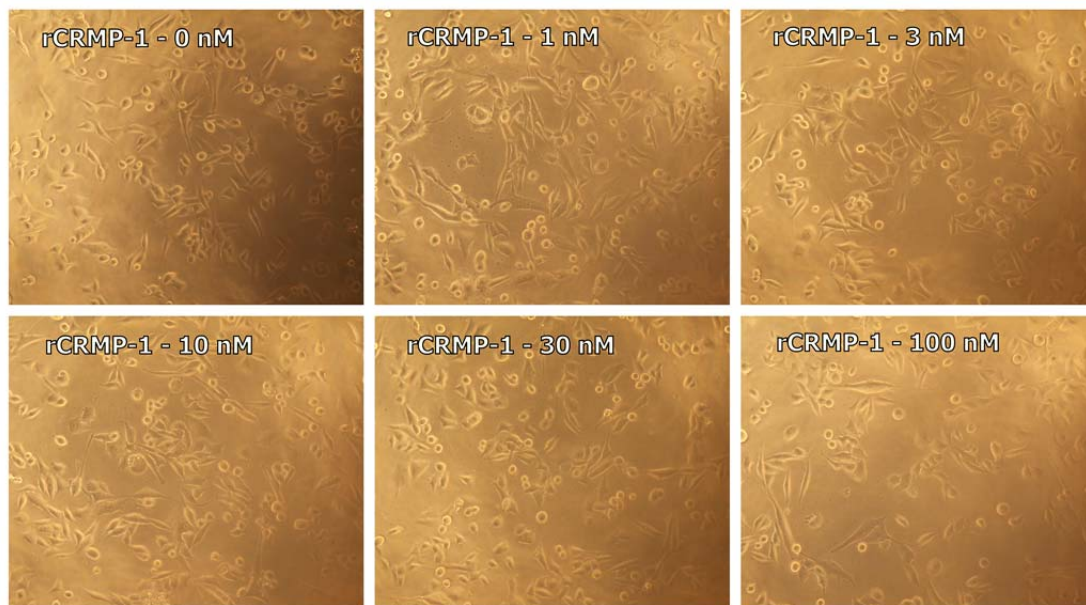


圖 8. HBHAc 與 FITC 接合順序對 FITC 螢光強度的影響

純化完成的 rCRMP-1 分成兩組，一組先進行螢光標定，再接上 HBHAc；另一組則先接上 HBHAc，在進行螢光標定。反應完成後以 495 nm 激發測量螢光值，實驗結果兩組以 rCRMP-1 的螢光值作為 100%，HBHAc-rCRMP-1 的螢光值除以 rCRMP-1 的螢光值計算螢光強度百分比。



A.



B.

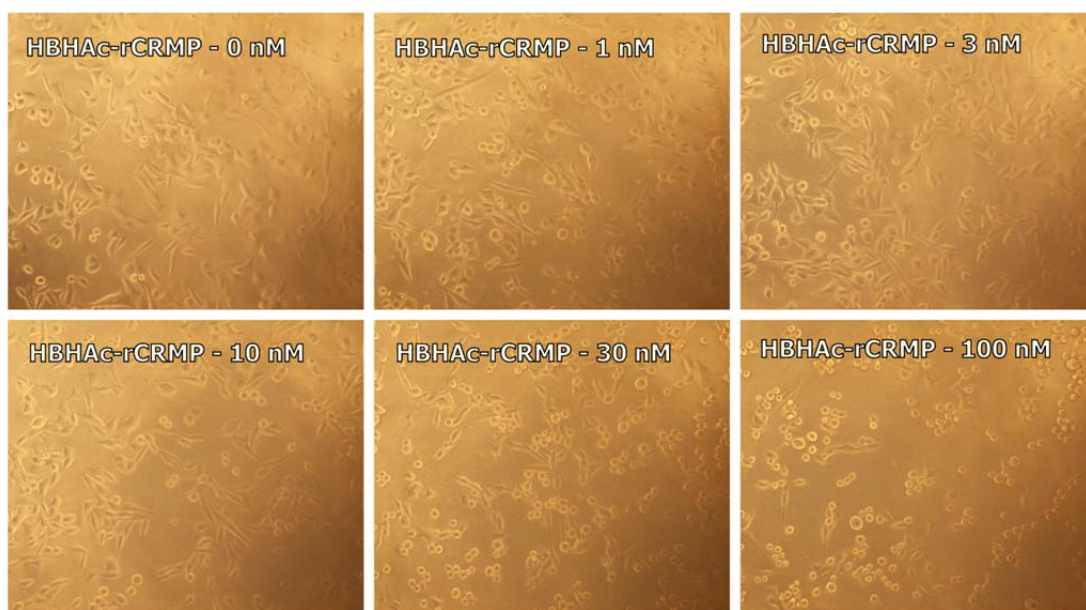
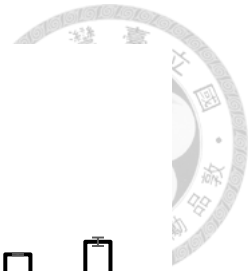


圖 9. 不同濃度 HBHAc-rCRMP-1 對 CL<sub>1-5</sub> 細胞型態的影響

將 CL<sub>1-5</sub> 細胞培養於 96 孔盤，隔天移除培養液，投予 0、1、3、10、30、100、300 nM 的 rCRMP-1 與 HBHAc-rCRMP-1，投藥 24 小時後觀察細胞型態變化。A 為 rCRMP-1 組的細胞型態；B 為 HBHAc-rCRMP-1 組的細胞型態。



## SRB assay in CL<sub>1-5</sub>

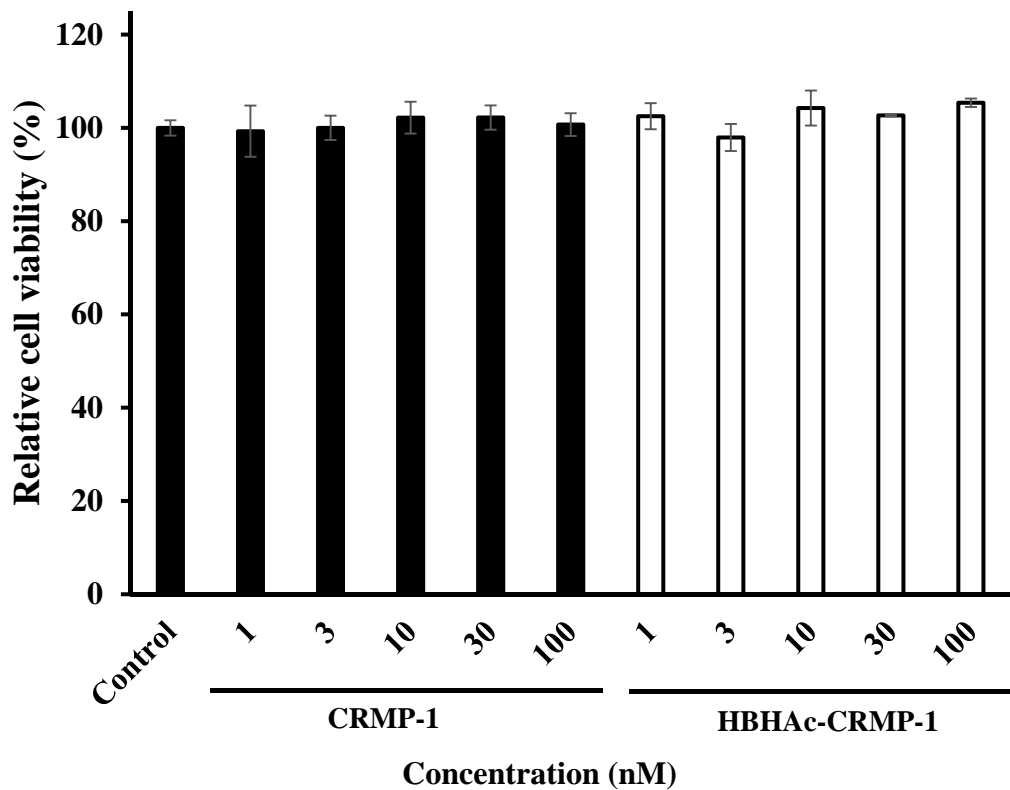


圖 10. HBHAc-rCRMP-1 對 CL<sub>1-5</sub> 的細胞毒性試驗 (SRB assay)

將 CL<sub>1-5</sub> 細胞培養於 96 孔盤，隔天移除培養液，投予 1、3、10、30、100 nM 的 rCRMP-1 與 HBHAc-rCRMP-1 作為實驗組，並投予 PBS (0 nM) 作為對照組，24 小時後固定細胞，以 0.4 % SRB 染劑進行染色，接著以 0.1% 醋酸進行退染三次，移除上清液後晾乾，加入 10 mM Tris 溶解紫色結晶，測量 515 nm 的吸光值。實驗結果以對照組吸光值作為 100% 存活率，實驗組每組吸光值除以對照組吸光值計算存活率，X 軸代表給藥濃度，Y 軸代表細胞存活率 (Mean±S.D., n = 3)。

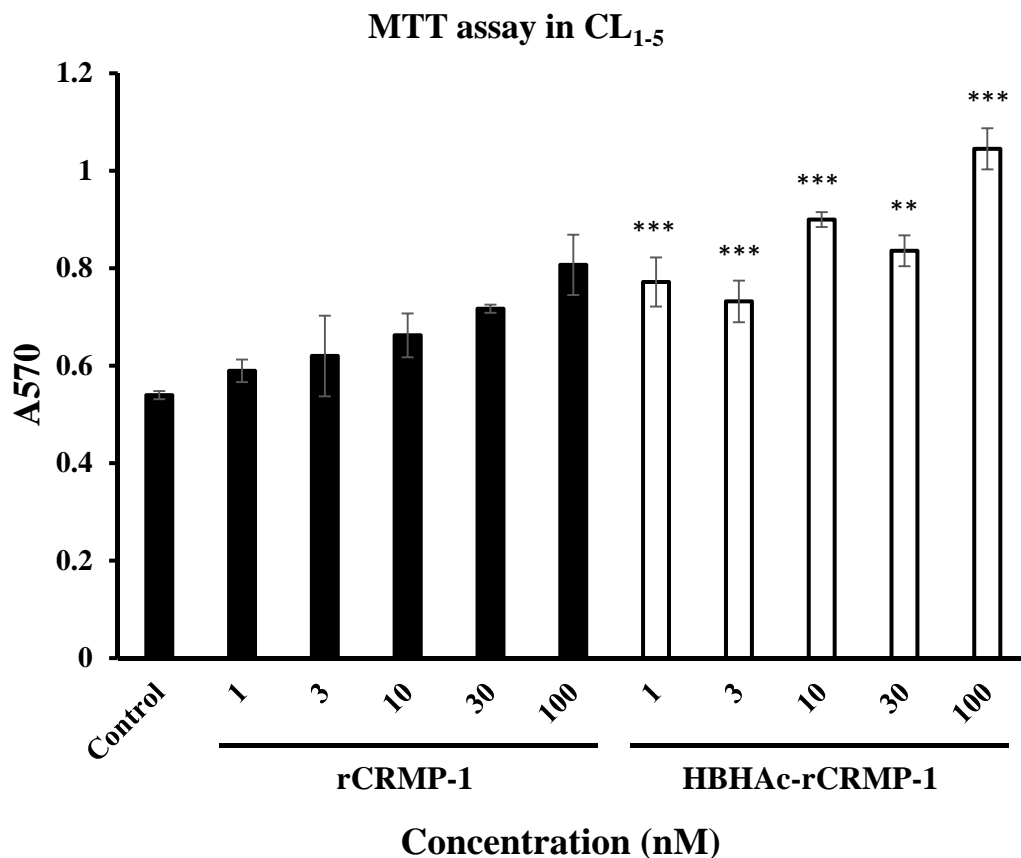


圖 11. HBHAc-rCRMP-1 對 CL<sub>1-5</sub> 的細胞毒性試驗 (MTT assay)

將 CL<sub>1-5</sub> 細胞培養於 96 孔盤，隔天移除培養液，投予 1、3、10、30、100 nM 的 rCRMP-1 與 HBHAc-rCRMP-1 作為實驗組，並投予 PBS (0 nM) 作為對照組，24 小時後加入終濃度 0.5 mg/mL 的 MTT 試劑，於 37°C 下培養 2 小時後移除培養液，加入 0.1 N HCl (in isopropanol) 溶解紫色結晶，測量 570 nm 的吸光值。X 軸代表給藥濃度，Y 軸代表吸光值 (Mean±S.D.)。與同濃度的 rCRMP-1 相比，\*\*代表  $p < 0.01$ ，\*\*\*代表  $p < 0.001$

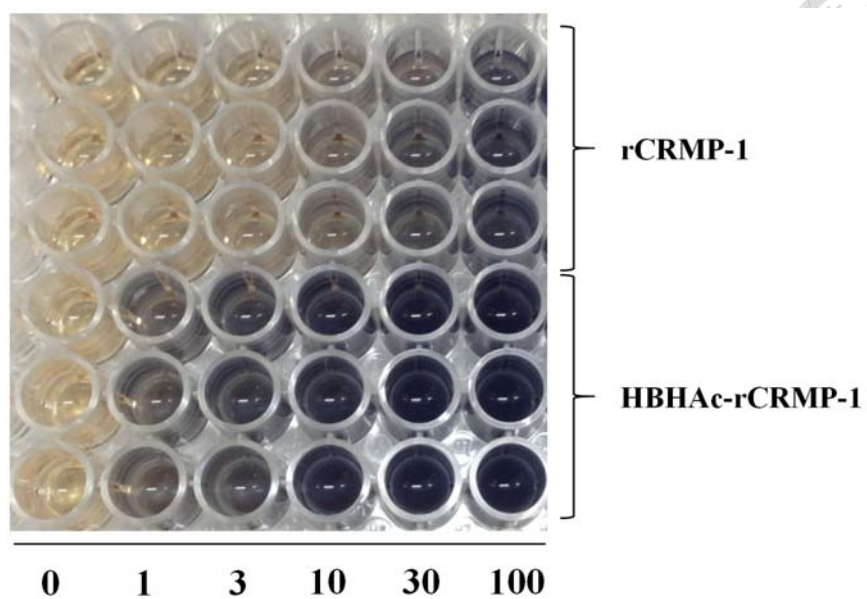


圖 12. 含藥培養液對 MTT 試劑呈色之影響

將 CL<sub>1-5</sub> 細胞培養於 96 孔盤，隔天移除培養液，投予 0、1、3、10、30、100 nM 的 rCRMP-1 與 HBHAc-rCRMP-1，24 小時後加入終濃度 0.5 mg/mL 的 MTT 試劑，於 37°C 下培養 2 小時後取出觀察顏色變化。

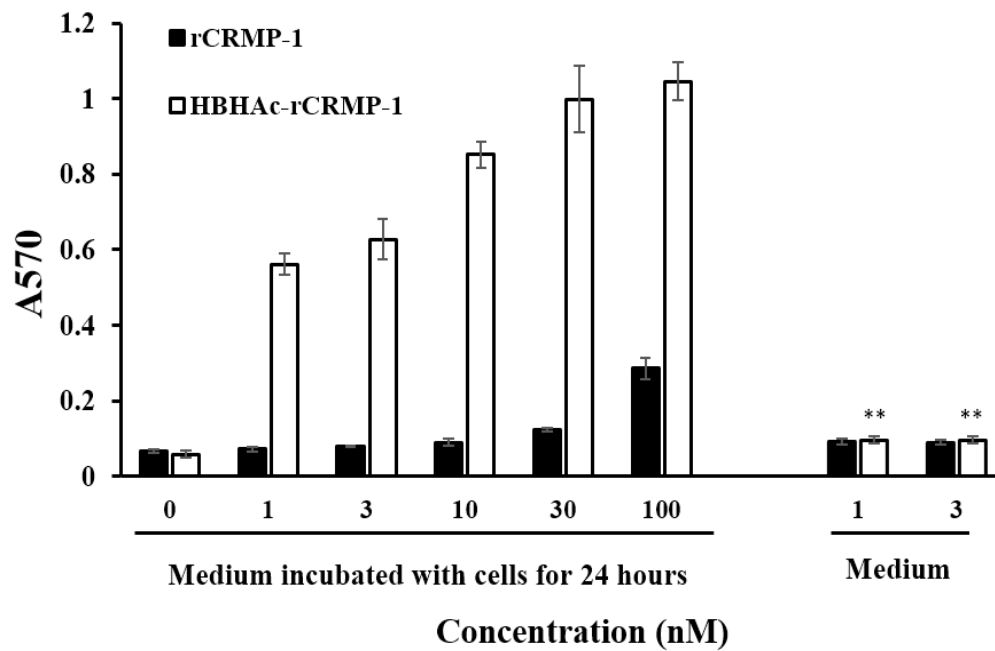


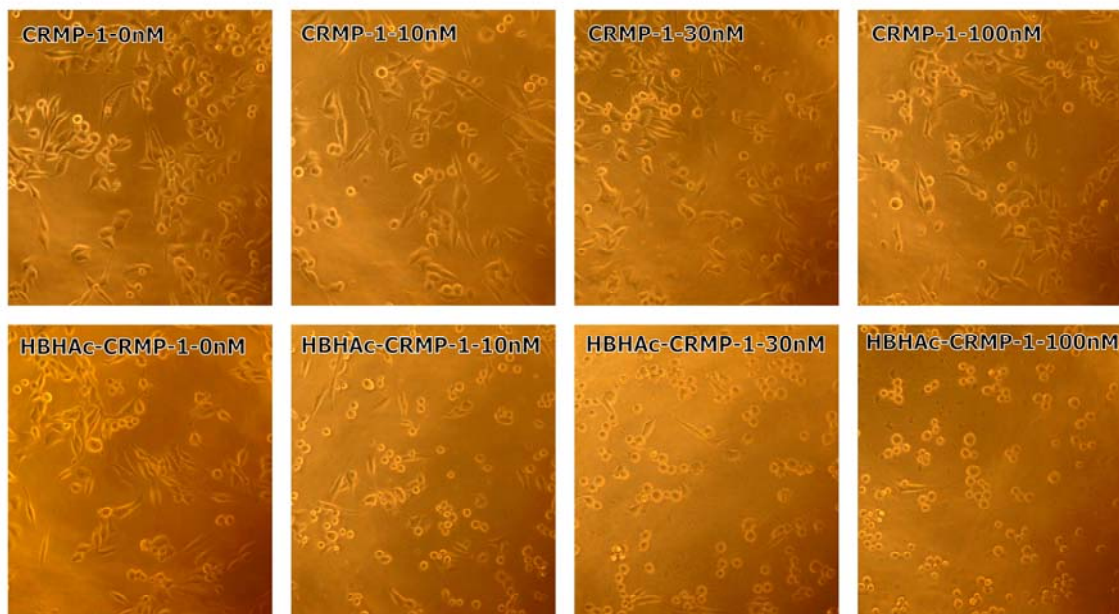
圖 13. 含藥培養液對 MTT 試劑吸光值之影響

將 CL<sub>1-5</sub> 細胞培養於 96 孔盤，隔天移除培養液，投予 0、1、3、10、30、100 nM 的 rCRMP-1 與 HBHAc-rCRMP-1，並給予 1、3 nM 的 rCRMP-1 與 HBHAc-rCRMP-1 至不含細胞的培養孔，24 小時後取出含藥培養液，加入終濃度 0.5 mg/mL 的 MTT 試劑，於 37°C 下培養 2 小時後測量 570 nm 的吸光值。X 軸代表給藥濃度，Y 軸代表吸光值 (Mean±S.D., n = 3)。與相同濃度的已培養過細胞的含藥培養液相比，\*\* 代表  $p < 0.01$ 。





A.



B.

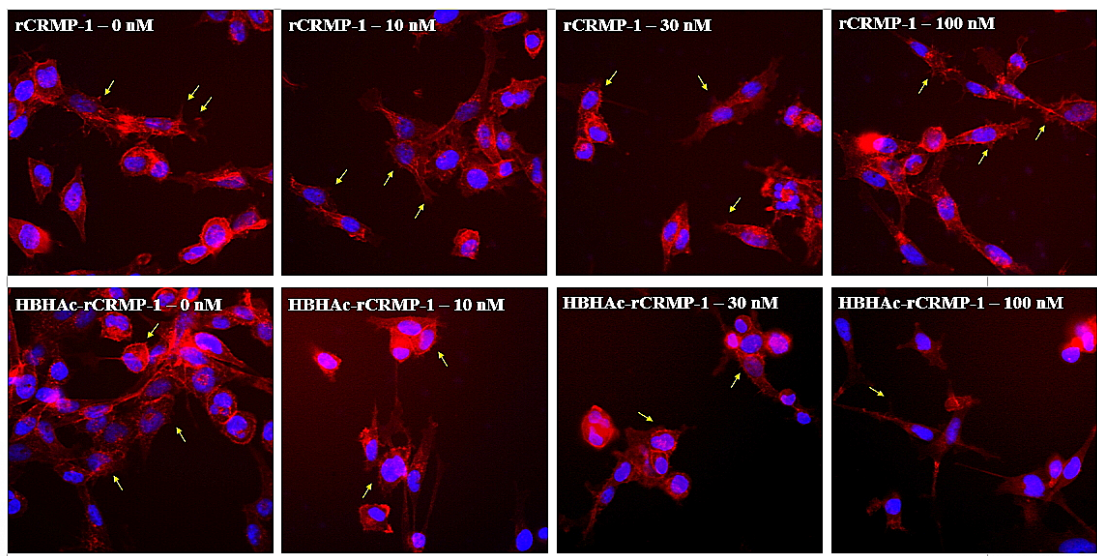


圖 14. rCRMP-1 與 HBHAc-rCRMP-1 投予 CL<sub>1-5</sub> 後的 actin 染色影像分析

將 CL<sub>1-5</sub> 細胞以 10<sup>4</sup> cells/well 的密度培養於 12 孔盤，培養 24 小時後，分別投予 10、30、100 nM 的 HBHAc-rCRMP-1 及 rCRMP-1 作為實驗組，同時投予 PBS 作為對照組。投藥 24 小時後以倒立式顯微鏡觀察細胞型態並照相，接著以 3.7 % paraformaldehyde 固定細胞，加入 1 : 40 AlexaFluor594-conjugated phalloidin (以 1X PBS 稀釋) 進行 actin 染色，於 37°C 的溫度下培養 1 小時後，再以 1 µg/mL Hoechst 33258 進行細胞核染色。觀察的儀器為國立臺灣大學藥學專業學院藥學系的 InCell Analyzer 2000，放大倍率為 40 倍。(A) CL<sub>1-5</sub> 細胞給藥 24 小時後的型態變化，(B) CL<sub>1-5</sub> 細胞給藥 24 小時後的 actin 螢光影像圖 (紅色螢光：actin，藍色：細胞核，黃色箭頭指得是絲狀偽足)。

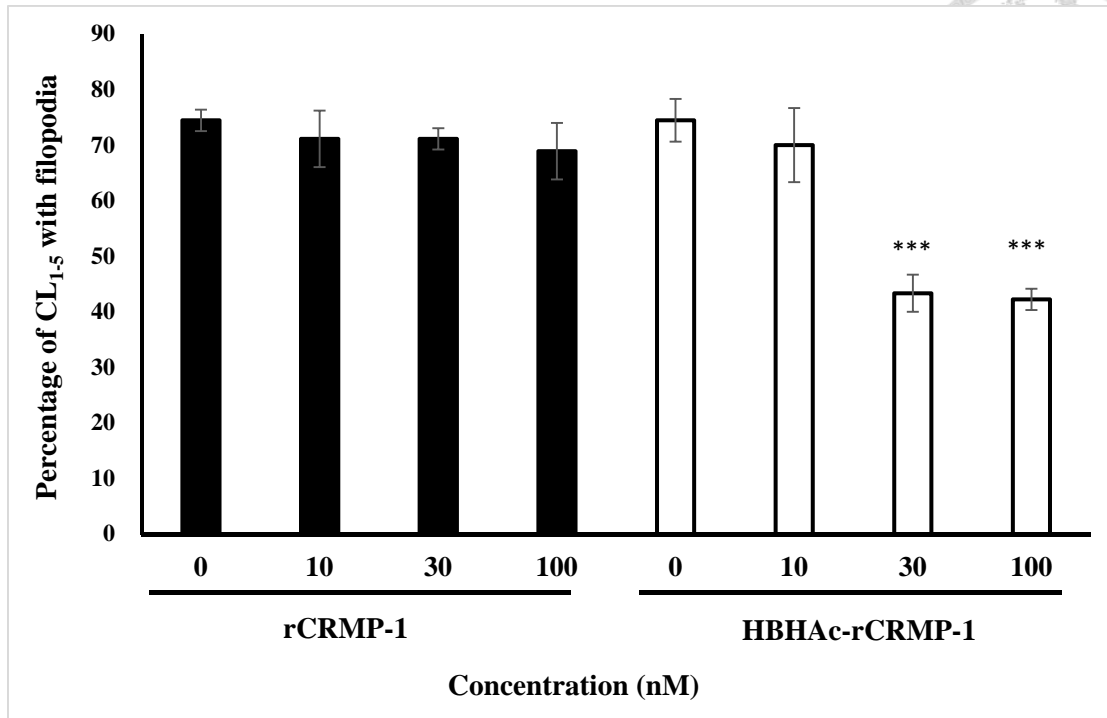
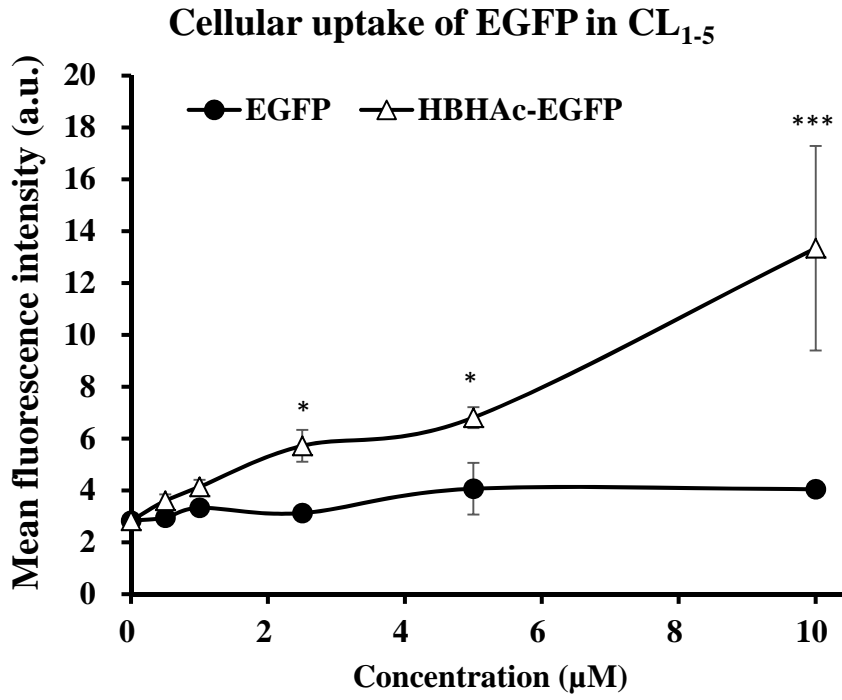


圖 15. 不同濃度 HBHAc-rCRMP-1 與 rCRMP-1 對 CL1-5 帶有絲狀偽足的比率之影響

將 CL<sub>1-5</sub> 細胞培養於 12 孔盤，培養 24 小時後，分別投予 10、30、100 nM 的 HBHAc-rCRMP-1 及 rCRMP-1 作為實驗組，同時投予 PBS 作為對照組，投藥 24 小時後，細胞進行 actin 螢光染色，每組計數 30 顆細胞並計算帶有絲狀偽足的細胞數，將帶有絲狀偽足的細胞數除以 30，再乘以 100% 計算出帶有絲狀偽足的 CL<sub>1-5</sub> 細胞比率，每個投藥組重複計算三次，實驗數值以 Mean±S.D. 表示

A.



B.

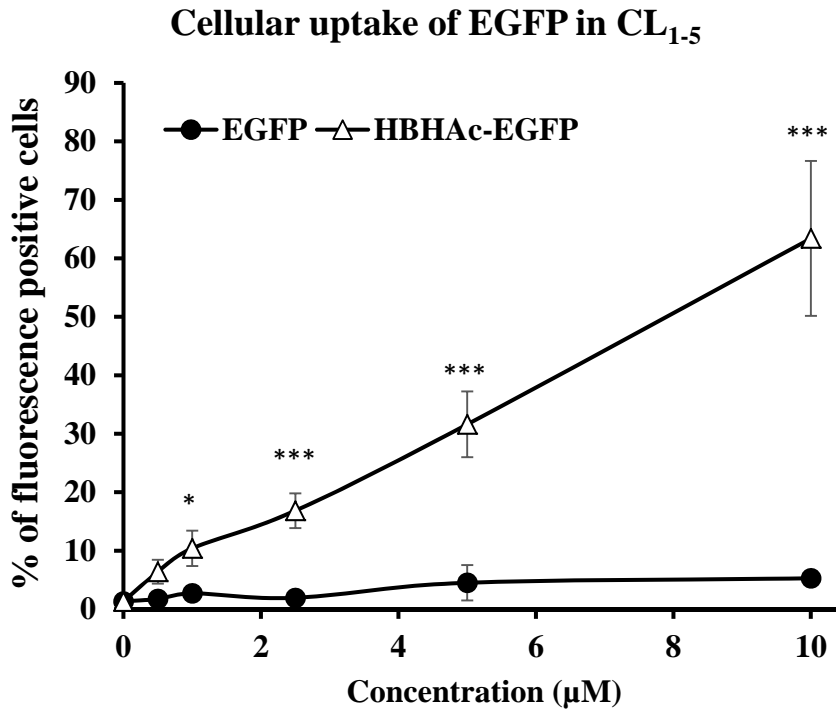


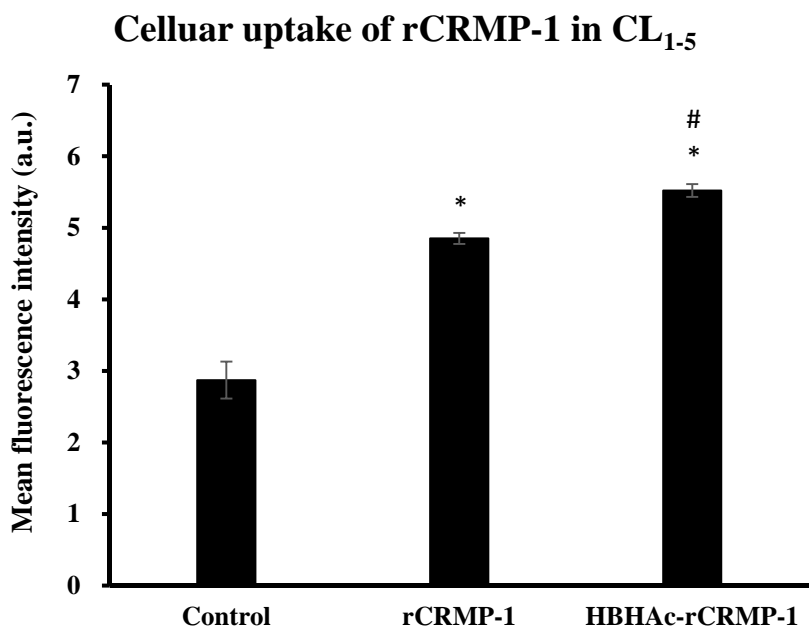
圖 16. HBHAc-EGFP 與 EGFP 於 CL<sub>1-5</sub> 的細胞攝取試驗分析

將 CL<sub>1-5</sub> 細胞培養於 24 孔盤，隔天投予 0、0.5、1、2.5、5、10  $\mu$ M 的 EGFP 與 HBHAc-EGFP，於 37°C 下培養 2 小時後，移除培養液並加入 100  $\mu$ L 0.05 % trypsin-EDTA 去除附著於細胞表面的 HBHAc-EGFP，反應 5 分鐘後收集細胞，以流式細胞儀進行螢光訊號分析。(A)投藥濃度與每顆細胞的平均螢光強度作圖；(B)投藥濃度與偵測到具有螢光訊號的細胞比率作圖 (Mean $\pm$ S.D.，n = 3)，HBHAc-EGFP 與同濃度的 EGFP 相比，\*代表  $p < 0.05$ ，\*\*\*代表  $p < 0.001$ 。





A.



B.

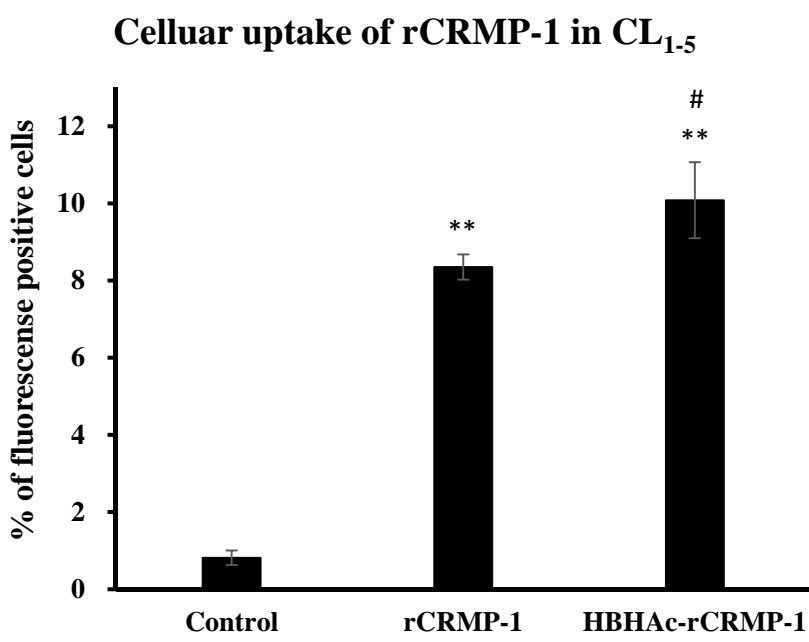


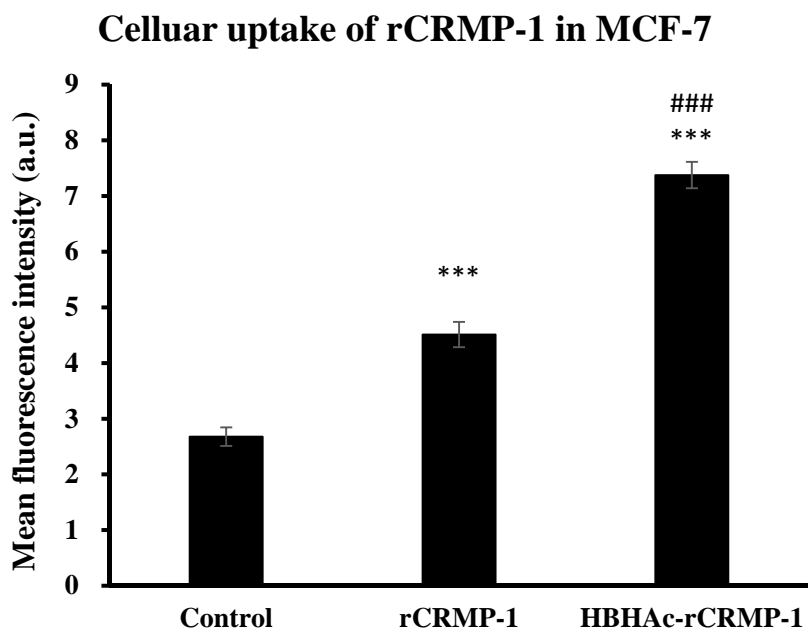


圖 17. HBHAc-rCRMP-1 於 CL<sub>1-5</sub> 細胞的螢光訊號強度分析

將 CL<sub>1-5</sub> 培養於 24 孔盤，隔天投予 300 nM 的 rCRMP-1 與 HBHAc-rCRMP-1 作為實驗組，並投予 1X PBS 作為對照組 (control)，於 37°C 下培養 2 小時後，移除培養液並加入 100  $\mu$ L 0.05 % trypsin-EDTA 去除附著於細胞表面的 HBHAc-CRMP-1，反應 5 分鐘後收集細胞，以流式細胞儀進行螢光訊號分析，HBHAc-rCRMP-1 與 rCRMP-1 之 specific fluorescence intensity 比值 (HBHAc-rCRMP-1/rCRMP-1) 為 0.901，測得之 HBHAc-rCRMP-1 的螢光強度除以 0.901 作為校正。(A) 投藥後每類細胞的平均螢光強度之分析圖，(B) 投藥後偵測到細胞帶有螢光訊號的之分析比率圖 (Mean $\pm$ S.D.，n = 3)。rCRMP-1 及 HBHAc-rCRMP-1 與對照組相比，\*代表  $p < 0.05$ ，\*\*代表  $p < 0.01$ 。HBHAc-rCRMP-1 與 rCRMP-1 相比，#代表  $p < 0.05$ 。



A.



B.

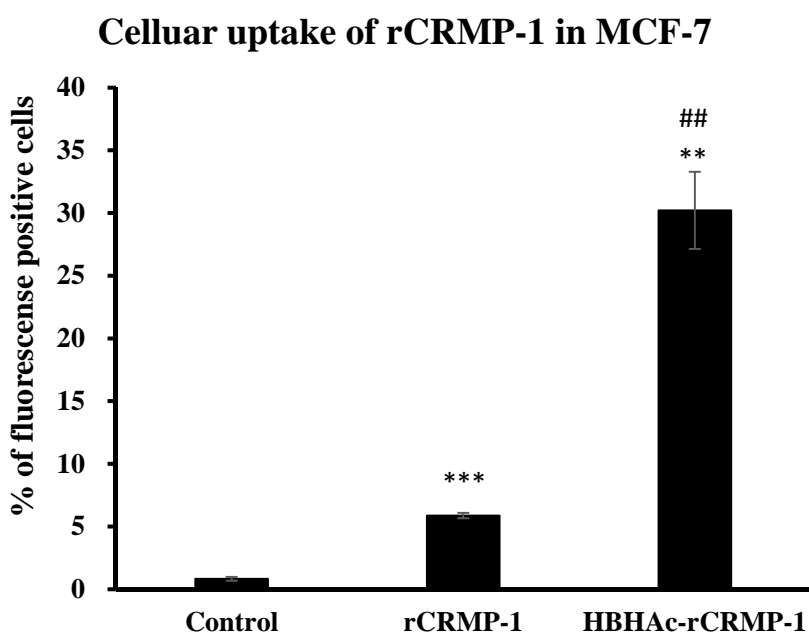






圖 18. HBHAc-rCRMP-1 於 MCF-7 細胞的螢光訊號強度分析

將 MCF-7 培養於 24 孔盤，隔天投予 300 nM 的 rCRMP-1 與 HBHAc-rCRMP-1 作為實驗組，並投予 1X PBS 作為對照組 (control)，於 37°C 下培養 2 小時後，移除培養液並加入 100  $\mu$ L 0.05 % trypsin-EDTA 去除附著於細胞表面的 HBHAc-CRMP-1，反應 5 分鐘後收集細胞，以流式細胞儀進行螢光訊號分析，HBHAc-rCRMP-1 與 rCRMP-1 之 specific fluorescence intensity 比值 (HBHAc-rCRMP-1/rCRMP-1) 為 0.901，測得之 HBHAc-rCRMP-1 的螢光強度除以 0.901 作為校正。(A) 投藥後每顆細胞的平均螢光強度之分析圖，(B) 投藥後偵測到細胞帶有螢光訊號的之分析比率圖 (Mean $\pm$ S.D., n = 3)。rCRMP-1 及 HBHAc-rCRMP-1 與對照組相比，\*\*代表  $p < 0.01$ ，\*\*\*代表  $p < 0.001$ 。HBHAc-rCRMP-1 與 rCRMP-1 相比，##代表  $p < 0.01$ ，###代表  $p < 0.001$ 。

表 1. 細胞穿透胜肽分類表 (依胜肽來源分類)

胜肽	來源	序列	參考文獻
<b>Protein-derived</b>			
Tat peptide	Tat protein	GRKKRRQRRRPPQ	24
Penetratin	Antennapedia	RQIKIWFQNRRMK WKK	26
pVEC	Cadherin	LLIILRRRIRKQAHA HSK	28
<b>Chimeric</b>			
Transportan	Galanine/Mastoparan	GWTLNSAGYLLGK INLKALAALAKKIL	29
MPG	HIV-gp41/SV40 T-antigen	GALFLGFLGAAGS TMGAWSQPKKKR KV	30
<b>Synthetic</b>			
Polyarginines	Based on Tat peptide	(R) <sub>n</sub> , 6 < n < 12	32, 33
R <sub>6</sub> W <sub>3</sub>	Based on penetratin	RRWWRRWRR	35



表 2. HBHA 蛋白 C 端相關胜肽的資料



胜肽名稱	序列	長度	分子量
	<b><u>R1</u> : <u>KKAAPA</u></b>		
	<b><u>R2</u> : <u>KKAAAKK</u></b>		
<b>Full HBHA</b>	<u>Y-KKAAPA-KKAAPA-KKAA</u>	36 mers	3572.47 Da
<b>(<u>3R1</u> + <u>2R2</u>)</b>	<u>PA-KKAAAKK-APA-KKAAA</u> <u>KK</u>		
<b>HBHAa</b>	<u>Y-KKAAPA-KKAAPA-KKAA</u>	19 mers	1881.31 Da
<b>(<u>3R1</u>)</b>	<u>PA-</u>		
<b>HBHAb</b>	<u>Y-KKAAPA-KKAAPA-</u>	29 mers	2846.53 Da
<b>(<u>3R1</u> + <u>1R2</u>)</b>	<u>KKAAPA-KKAAAKK-APA</u>		
<b>HBHAc</b>	<u>C-Y-KKAAPA-KKAAAKK-AP</u>	25 mers	2542.19 Da
<b>(<u>1R1</u> + <u>2R2</u>)</b>	<u>A-KKAAAKK</u>		
<b>HBHAd</b>	<u>Y-KKAAPA-KKAAPA-KKAA</u>	30 mers	3005.76 Da
<b>(<u>2R1</u> + <u>2R2</u>)</b>	<u>AKK-APA-KKAAAKK</u>		
<b>HBHAe</b>	<u>C-Y-KKAAAKK-APA-KKAAA</u>	19 mers	1975.48 Da
<b>(<u>2R2</u>)</b>	<u>KK</u>		

表 3. 各 CRMP 的基因序列相似比率 (老鼠)

	<b>CRMP-1</b>	<b>CRMP-2</b>	<b>CRMP-3</b>	<b>CRMP-4</b>	<b>CRMP-5</b>
<b>CRMP-1</b>		76%	69%	74%	49%
<b>CRMP-2</b>	76%		75%	76%	50%
<b>CRMP-3</b>	69%	75%		69%	50%
<b>CRMP-4</b>	74%	76%	69%		49%
<b>CRMP-5</b>	49%	50%	50%	49%	

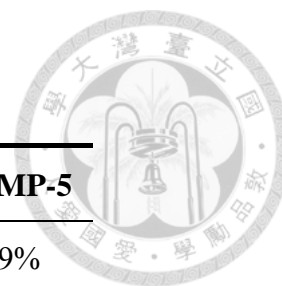


表 4. rCRMP-1 透析液及透析條件

步驟	透析液	透析條件
1 <sup>st</sup>	Dialysis buffer <sup>a</sup> (4 M urea)	於 4°C 冰箱中進行透析、每 4 - 6 個小時 換一次透析液，每步驟中更換 2 次，逐 步的減少尿素 (urea) 濃度，使得 rCRMP-1 再折疊成活性狀態。
2 <sup>nd</sup>	Dialysis buffer (2 M urea)	
3 <sup>rd</sup>	Dialysis buffer (1 M urea)	
4 <sup>th</sup>	Dialysis buffer (0 M urea)	

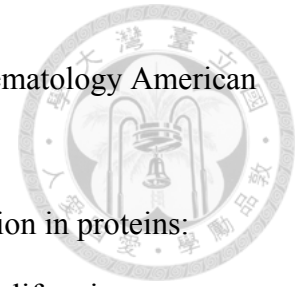
- a. Dialysis buffer 選擇依 high-throughput screening test 之結果決定，buffer 組成為 50 mM Tris、0.1 % mannitol (pH 9.0)。



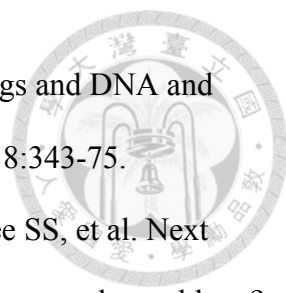
## 參考文獻

1. Banting FG, Best CH, Collip JB, Campbell WR, Fletcher AA. Pancreatic extracts in the treatment of diabetes mellitus: preliminary report. 1922. CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne. 1991; 145:1281-6.
2. Stryjewska A, Kiepusa K, Librowski T, Lochynski S. Biotechnology and genetic engineering in the new drug development. Part I. DNA technology and recombinant proteins. Pharmacological reports : PR. 2013; 65:1075-85.
3. Richter B, Neises G. 'Human' insulin versus animal insulin in people with diabetes mellitus. The Cochrane database of systematic reviews. 2002:Cd003816.
4. Baker EN, Blundell TL, Cutfield JF, Cutfield SM, Dodson EJ, Dodson GG, et al. The structure of 2Zn pig insulin crystals at 1.5 Å resolution. Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences. 1988; 319:369-456.
5. Laub O, Rutter WJ. Expression of the human insulin gene and cDNA in a heterologous mammalian system. The Journal of biological chemistry. 1983; 258:6043-50.
6. Nielsen J. Production of biopharmaceutical proteins by yeast: advances through metabolic engineering. Bioengineered. 2013; 4:207-11.
7. Lundby C, Olsen NV. Effects of recombinant human erythropoietin in normal humans. The Journal of physiology. 2011; 589:1265-71.
8. Johnson KP, Panitch HS. Effects of experimental recombinant interferons on multiple sclerosis. Transactions of the American Clinical and Climatological Association. 1989; 100:171-6.
9. Shapiro AD. Long-lasting recombinant factor VIII proteins for hemophilia A.

Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology American Society of Hematology Education Program. 2013; 2013:37-43.



10. Reissner KJ, Aswad DW. Deamidation and isoaspartate formation in proteins: unwanted alterations or surreptitious signals? Cellular and molecular life sciences : CMLS. 2003; 60:1281-95.
11. Lam XM, Yang JY, Cleland JL. Antioxidants for prevention of methionine oxidation in recombinant monoclonal antibody HER2. Journal of pharmaceutical sciences. 1997; 86:1250-5.
12. Manning MC, Chou DK, Murphy BM, Payne RW, Katayama DS. Stability of protein pharmaceuticals: an update. Pharmaceutical research. 2010; 27:544-75.
13. Fayos R, Pons M, Millet O. On the origin of the thermostabilization of proteins induced by sodium phosphate. Journal of the American Chemical Society. 2005; 127:9690-1.
14. Ruiz L, Aroche K, Reyes N. Aggregation of recombinant human interferon alpha 2b in solution: technical note. AAPS PharmSciTech. 2006; 7:99.
15. Arakawa T, Timasheff SN. Stabilization of protein structure by sugars. Biochemistry. 1982; 21:6536-44.
16. Lee JC, Timasheff SN. The stabilization of proteins by sucrose. The Journal of biological chemistry. 1981; 256:7193-201.
17. Otzen DE, Knudsen BR, Aachmann F, Larsen KL, Wimmer R. Structural basis for cyclodextrins' suppression of human growth hormone aggregation. Protein science : a publication of the Protein Society. 2002; 11:1779-87.
18. Chou DK, Krishnamurthy R, Randolph TW, Carpenter JF, Manning MC. Effects of Tween 20 and Tween 80 on the stability of Albutropin during agitation. Journal of pharmaceutical sciences. 2005; 94:1368-81.

- 
19. Torchilin VP. Recent approaches to intracellular delivery of drugs and DNA and organelle targeting. *Annual review of biomedical engineering*. 2006; 8:343-75.
  20. Sharma AR, Kundu SK, Nam JS, Sharma G, Priya Doss CG, Lee SS, et al. Next generation delivery system for proteins and genes of therapeutic purpose: why and how? *BioMed research international*. 2014; 2014:327950.
  21. Bechara C, Sagan S. Cell-penetrating peptides: 20 years later, where do we stand? *FEBS letters*. 2013; 587:1693-702.
  22. Frankel AD, Pabo CO. Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell*. 1988; 55:1189-93.
  23. Green M, Loewenstein PM. Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat trans-activator protein. *Cell*. 1988; 55:1179-88.
  24. Vives E, Brodin P, Lebleu B. A Truncated HIV-1 Tat Protein Basic Domain Rapidly Translocates through the Plasma Membrane and Accumulates in the Cell Nucleus. *Journal of Biological Chemistry*. 1997; 272:16010-7.
  25. Joliot A, Pernelle C, Deagostini-Bazin H, Prochiantz A. Antennapedia homeobox peptide regulates neural morphogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1991; 88:1864-8.
  26. Derossi D, Joliot AH, Chassaing G, Prochiantz A. The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. *The Journal of biological chemistry*. 1994; 269:10444-50.
  27. Milletti F. Cell-penetrating peptides: classes, origin, and current landscape. *Drug discovery today*. 2012; 17:850-60.
  28. Elmquist A, Lindgren M, Bartfai T, Langel U. VE-cadherin-derived cell-penetrating peptide, pVEC, with carrier functions. *Experimental cell research*. 2001;



269:237-44.

29. Pooga M, Hällbrink M, Zorko M, Langel Ü. Cell penetration by transportan.

FASEB Journal. 1998; 12:67-77.

30. Morris MC, Vidal P, Chaloin L, Heitz F, Divita G. A new peptide vector for efficient delivery of oligonucleotides into mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* 1997; 25:2730-6.

31. Morris MC, Depollier J, Mery J, Heitz F, Divita G. A peptide carrier for the delivery of biologically active proteins into mammalian cells. *Nat Biotechnol.* 2001; 19:1173-6.

32. Mitchell DJ, Kim DT, Steinman L, Fathman CG, Rothbard JB. Polyarginine enters cells more efficiently than other polycationic homopolymers. *J Pept Res.* 2000; 56:318-25.

33. Futaki S, Suzuki T, Ohashi W, Yagami T, Tanaka S, Ueda K, et al. Arginine-rich peptides. An abundant source of membrane-permeable peptides having potential as carriers for intracellular protein delivery. *The Journal of biological chemistry.* 2001; 276:5836-40.

34. Oehlke J, Scheller A, Wiesner B, Krause E, Beyermann M, Klauschenz E, et al. Cellular uptake of an alpha-helical amphipathic model peptide with the potential to deliver polar compounds into the cell interior non-endocytically. *Bba-Biomembranes.* 1998; 1414:127-39.

35. Delaroche D, Aussedat B, Aubry S, Chassaing G, Burlina F, Clodic G, et al. Tracking a new cell-penetrating (W/R) nonapeptide, through an enzyme-stable mass spectrometry reporter tag. *Anal Chem.* 2007; 79:1932-8.


36. Marks JR, Placone J, Hristova K, Wimley WC. Spontaneous membrane-translocating peptides by orthogonal high-throughput screening. *Journal of*




the American Chemical Society. 2011; 133:8995-9004.

37. Shi NQ, Qi XR, Xiang B, Zhang Y. A survey on "Trojan Horse" peptides: Opportunities, issues and controlled entry to "Troy". *Journal of controlled release* : official journal of the Controlled Release Society. 2014; 194C:53-70.
38. Vasconcelos L, Parn K, Langel U. Therapeutic potential of cell-penetrating peptides. *Therapeutic delivery*. 2013; 4:573-91.
39. Heitz F, Morris MC, Divita G. Twenty years of cell-penetrating peptides: from molecular mechanisms to therapeutics. *British journal of pharmacology*. 2009; 157:195-206.
40. Lee SH, Castagner B, Leroux JC. Is there a future for cell-penetrating peptides in oligonucleotide delivery? *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics* : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik eV. 2013; 85:5-11.
41. Koppelhus U, Awasthi SK, Zachar V, Holst HU, Ebbesen P, Nielsen PE. Cell-dependent differential cellular uptake of PNA, peptides, and PNA-peptide conjugates. *Antisense & nucleic acid drug development*. 2002; 12:51-63.
42. Menozzi FD, Rouse JH, Alavi M, Laude-Sharp M, Muller J, Bischoff R, et al. Identification of a heparin-binding hemagglutinin present in mycobacteria. *The Journal of experimental medicine*. 1996; 184:993-1001.
43. Pethe K, Alonso S, Biet F, Delogu G, Brennan MJ, Loch C, et al. The heparin-binding haemagglutinin of *M. tuberculosis* is required for extrapulmonary dissemination. *Nature*. 2001; 412:190-4.
44. Delogu G, Fadda G, Brennan MJ. Impact of structural domains of the heparin binding hemagglutinin of *Mycobacterium tuberculosis* on function. *Protein and peptide letters*. 2012; 19:1035-9.



- 
45. Delogu G, Brennan MJ. Functional domains present in the mycobacterial hemagglutinin, HBHA. *Journal of bacteriology*. 1999; 181:7464-9.
46. Pethe K, Aumercier M, Fort E, Gatot C, Loch C, Menozzi FD. Characterization of the heparin-binding site of the mycobacterial heparin-binding hemagglutinin adhesin. *The Journal of biological chemistry*. 2000; 275:14273-80.
47. 鄭如辰. 研究肝素結合凝血附著素相關胜肽之穿胞運輸性質: 臺灣大學; 2009.
48. 邱予芹. 研究肝素結合凝血附著素 c 之蛋白質運送能力: 臺灣大學; 2010.
49. 康竣歲. 含穿胞胜肽 HBHAc 之重組綠色螢光蛋白於肝癌細胞株的胞內運輸之研究: 臺灣大學; 2012.
50. Wu FL, Yeh TH, Chen YL, Chiu YC, Cheng JC, Wei MF, et al. Intracellular Delivery of Recombinant Arginine Deiminase (rADI) by Heparin-Binding Hemagglutinin Adhesion Peptide Restores Sensitivity in rADI-Resistant Cancer Cells. *Molecular pharmaceutics*. 2014; 11:2777-86.
51. Goshima Y, Nakamura F, Strittmatter P, Strittmatter SM. Collapsin-induced growth cone collapse mediated by an intracellular protein related to UNC-33. *Nature*. 1995; 376:509-14.
52. Li W, Herman RK, Shaw JE. Analysis of the *Caenorhabditis elegans* axonal guidance and outgrowth gene *unc-33*. *Genetics*. 1992; 132:675-89.
53. Charrier E, Reibel S, Rogemond V, Aguera M, Thomasset N, Honnorat J. Collapsin response mediator proteins (CRMPs): involvement in nervous system development and adult neurodegenerative disorders. *Molecular neurobiology*. 2003; 28:51-64.
54. Hamajima N, Matsuda K, Sakata S, Tamaki N, Sasaki M, Nonaka M. A novel gene family defined by human dihydropyrimidinase and three related proteins with differential tissue distribution. *Gene*. 1996; 180:157-63.

- 
55. Schmidt EF, Strittmatter SM. The CRMP family of proteins and their role in Sema3A signaling. *Advances in experimental medicine and biology*. 2007; 600:1-11.
56. Deo RC, Schmidt EF, Elhabazi A, Togashi H, Burley SK, Strittmatter SM. Structural bases for CRMP function in plexin-dependent semaphorin3A signaling. *The EMBO journal*. 2004; 23:9-22.
57. Uchida Y, Ohshima T, Sasaki Y, Suzuki H, Yanai S, Yamashita N, et al. Semaphorin3A signalling is mediated via sequential Cdk5 and GSK3beta phosphorylation of CRMP2: implication of common phosphorylating mechanism underlying axon guidance and Alzheimer's disease. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms*. 2005; 10:165-79.
58. Shih JY, Lee YC, Yang SC, Hong TM, Huang CY, Yang PC. Collapsin response mediator protein-1: a novel invasion-suppressor gene. *Clinical & experimental metastasis*. 2003; 20:69-76.
59. Lin PC, Chan PM, Hall C, Manser E. Collapsin response mediator proteins (CRMPs) are a new class of microtubule-associated protein (MAP) that selectively interacts with assembled microtubules via a taxol-sensitive binding interaction. *The Journal of biological chemistry*. 2011; 286:41466-78.
60. Cole AR, Causeret F, Yadirgi G, Hastie CJ, McLauchlan H, McManus EJ, et al. Distinct priming kinases contribute to differential regulation of collapsin response mediator proteins by glycogen synthase kinase-3 in vivo. *The Journal of biological chemistry*. 2006; 281:16591-8.
61. Buel GR, Rush J, Ballif BA. Fyn promotes phosphorylation of collapsin response mediator protein 1 at tyrosine 504, a novel, isoform-specific regulatory site. *Journal of cellular biochemistry*. 2010; 111:20-8.
62. Yamashita N, Nakamura F, Goshima Y. [Role of Cdk5 in axon guidance and

synapse development]. Tanpakushitsu kakusan koso Protein, nucleic acid, enzyme.

2009; 54:802-7.

63. Steeg PS. Collapsin response mediator protein-1: a lung cancer invasion suppressor gene with nerve. *Journal of the National Cancer Institute*. 2001; 93:1364-5.

64. Yang PC, Luh KT, Wu R, Wu CW. Characterization of the mucin differentiation in human lung adenocarcinoma cell lines. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 1992; 7:161-71.

65. Chu YW, Yang PC, Yang SC, Shyu YC, Hendrix MJ, Wu R, et al. Selection of invasive and metastatic subpopulations from a human lung adenocarcinoma cell line. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 1997; 17:353-60.

66. Shih JY, Yang SC, Hong TM, Yuan A, Chen JJ, Yu CJ, et al. Collapsin response mediator protein-1 and the invasion and metastasis of cancer cells. *Journal of the National Cancer Institute*. 2001; 93:1392-400.

67. Gao M, Yeh PY, Lu YS, Chang WC, Kuo ML, Cheng AL. NF-kappaB p50 promotes tumor cell invasion through negative regulation of invasion suppressor gene CRMP-1 in human lung adenocarcinoma cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 2008; 376:283-7.

68. Yasumitsu H, Ozeki Y, Kawsar SM, Fujii Y, Sakagami M, Matuo Y, et al. RAMA stain: a fast, sensitive and less protein-modifying CBB R250 stain. *Electrophoresis*. 2010; 31:1913-7.

69. Vincentelli R, Canaan S, Campanacci V, Valencia C, Maurin D, Frassinetti F, et al. High-throughput automated refolding screening of inclusion bodies. *Protein science : a publication of the Protein Society*. 2004; 13:2782-92.

70. Dechavanne V, Barrillat N, Borlat F, Hermant A, Magnenat L, Paquet M, et al. A high-throughput protein refolding screen in 96-well format combined with design of

experiments to optimize the refolding conditions. Protein expression and purification. 2011; 75:192-203.

71. Huang T, Long M, Huo B. Competitive Binding to Cuprous Ions of Protein and BCA in the Bicinchoninic Acid Protein Assay. The open biomedical engineering journal. 2010; 4:271-8.

72. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. Analytical biochemistry. 1985; 150:76-85.

73. McKinney RM, Spillane JT, Pearce GW. Factors Affecting the Rate of Reaction of Fluorescein Isothiocyanate with Serum Proteins. Journal of immunology. 1964; 93:232-42.

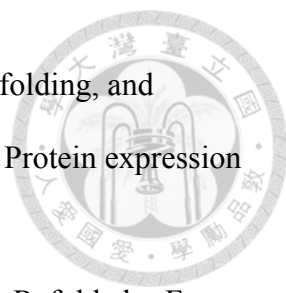
74. The TH, Feltkamp TE. Conjugation of fluorescein isothiocyanate to antibodies. I. Experiments on the conditions of conjugation. Immunology. 1970; 18:865-73.

75. Carlsson J, Drevin H, Axen R. Protein thiolation and reversible protein-protein conjugation. N-Succinimidyl 3-(2-pyridyldithio)propionate, a new heterobifunctional reagent. The Biochemical journal. 1978; 173:723-37.

76. Liu Y, Peterson DA, Kimura H, Schubert D. Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. Journal of neurochemistry. 1997; 69:581-93.

77. Keepers YP, Pizao PE, Peters GJ, van Ark-Otte J, Winograd B, Pinedo HM. Comparison of the sulforhodamine B protein and tetrazolium (MTT) assays for in vitro chemosensitivity testing. European journal of cancer. 1991; 27:897-900.

78. Lei SP, Lin HC, Wang SS, Callaway J, Wilcox G. Characterization of the Erwinia carotovora pelB gene and its product pectate lyase. Journal of bacteriology. 1987; 169:4379-83.

- 
79. Lu H, Zang Y, Ze Y, Zhu J, Chen T, Han J, et al. Expression, refolding, and characterization of a novel recombinant dual human stem cell factor. *Protein expression and purification*. 2005; 43:126-32.
80. Song HN, Jang JH, Kim YW, Kim DH, Park SG, Lee MK, et al. Refolded scFv Antibody Fragment against Myoglobin Shows Rapid Reaction Kinetics. *International journal of molecular sciences*. 2014; 15:23658-71.
81. Mukherjee KJ, Rowe DCD, Watkins NA, Summers DK. Studies of Single-Chain Antibody Expression in Quiescent *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2004; 70:3005-12.
82. Hill J, Montgomery DS, Kay J. Human cathepsin E produced in *E. coli*. *FEBS letters*. 1993; 326:101-4.
83. Lin K, Crocker JC, Prasad VV, Schofield A, Weitz DA, Lubensky TC, et al. Entropically driven colloidal crystallization on patterned surfaces. *Physical review letters*. 2000; 85:1770-3.
84. Lau AW, Lin KH, Yodh AG. Entropic interactions in suspensions of semiflexible rods: short-range effects of flexibility. *Physical review E, Statistical, nonlinear, and soft matter physics*. 2002; 66:020401.
85. Ackerson BJ, Pusey PN. Shear-induced order in suspensions of hard spheres. *Physical review letters*. 1988; 61:1033-6.
86. Jungbauer A, Kaar W, Schlegl R. Folding and refolding of proteins in chromatographic beds. *Curr Opin Biotechnol*. 2004; 15:487-94.
87. Clark EDB. Refolding of recombinant proteins. *Curr Opin Biotech*. 1998; 9:157-63.
88. Mittal S, Singh LR. Denatured state structural property determines protein stabilization by macromolecular crowding: a thermodynamic and structural approach.

PloS one. 2013; 8:e78936.

89. Bell CW, Fricks BE, Rocca JD, Steinweg JM, McMahon SK, Wallenstein MD.

High-throughput fluorometric measurement of potential soil extracellular enzyme activities. *Journal of visualized experiments : JoVE*. 2013:e50961.

90. Good NE, Winget GD, Winter W, Connolly TN, Izawa S, Singh RM. Hydrogen ion buffers for biological research. *Biochemistry*. 1966; 5:467-77.

91. Patel K, Borchardt RT. Chemical pathways of peptide degradation. II. Kinetics of deamidation of an asparaginy residue in a model hexapeptide. *Pharmaceutical research*. 1990; 7:703-11.

92. Tomizawa H, Yamada H, Wada K, Imoto T. Stabilization of lysozyme against irreversible inactivation by suppression of chemical reactions. *Journal of biochemistry*. 1995; 117:635-40.

93. Lu H, Zhang H, Wang Q, Yuan H, He W, Zhao Z, et al. Purification, refolding of hybrid hIFN $\gamma$ -kringle 5 expressed in *Escherichia coli*. *Current microbiology*. 2001; 42:211-6.

94. Kerwin BA, Heller MC, Levin SH, Randolph TW. Effects of Tween 80 and sucrose on acute short-term stability and long-term storage at -20 degrees C of a recombinant hemoglobin. *Journal of pharmaceutical sciences*. 1998; 87:1062-8.

95. Bondos SE, Bicknell A. Detection and prevention of protein aggregation before, during, and after purification. *Analytical biochemistry*. 2003; 316:223-31.

96. Shaltiel-Karyo R, Frenkel-Pinter M, Rockenstein E, Patrick C, Levy-Sakin M, Schiller A, et al. A blood-brain barrier (BBB) disrupter is also a potent alpha-synuclein (alpha-syn) aggregation inhibitor: a novel dual mechanism of mannitol for the treatment of Parkinson disease (PD). *The Journal of biological chemistry*. 2013; 288:17579-88.

97. Gekko K, Morikawa T. Preferential hydration of bovine serum albumin in





polyhydric alcohol-water mixtures. *Journal of biochemistry*. 1981; 90:39-50.

98. Xie GF, Timasheff SN. Mechanism of the stabilization of ribonuclease A by sorbitol: Preferential hydration is greater for the denatured than for the native protein. *Protein Science*. 1997; 6:211-21.

99. El-Andaloussi S, Jarver P, Johansson HJ, Langel U. Cargo-dependent cytotoxicity and delivery efficacy of cell-penetrating peptides: a comparative study. *The Biochemical journal*. 2007; 407:285-92.

100. Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, et al. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *Journal of the National Cancer Institute*. 1990; 82:1107-12.

101. Vichai V, Kirtikara K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nature protocols*. 2006; 1:1112-6.

102. Chakrabarti R, Kundu S, Kumar S, Chakrabarti R. Vitamin A as an enzyme that catalyzes the reduction of MTT to formazan by vitamin C. *Journal of cellular biochemistry*. 2000; 80:133-8.

103. Pagliacci MC, Spinozzi F, Migliorati G, Fumi G, Smacchia M, Grignani F, et al. Genistein inhibits tumour cell growth in vitro but enhances mitochondrial reduction of tetrazolium salts: a further pitfall in the use of the MTT assay for evaluating cell growth and survival. *European journal of cancer*. 1993; 29a:1573-7.

104. Bernhard D, Schwaiger W, Crazzolaro R, Tinhofer I, Kofler R, Csordas A. Enhanced MTT-reducing activity under growth inhibition by resveratrol in CEM-C7H2 lymphocytic leukemia cells. *Cancer letters*. 2003; 195:193-9.

105. Funk D, Schrenk H-H, Frei E. Serum albumin leads to false-positive results in the XTT and the MTT assay. *BioTechniques*. 2007; 43:178-86.

106. Pan SH, Chao YC, Hung PF, Chen HY, Yang SC, Chang YL, et al. The ability of

LCRMP-1 to promote cancer invasion by enhancing filopodia formation is antagonized by CRMP-1. *The Journal of clinical investigation*. 2011; 121:3189-205.

107. Tavare JM, Fletcher LM, Welsh GI. Review - Using green fluorescent protein to study intracellular signalling. *J Endocrinol*. 2001; 170:297-306.

108. Rusnati M, Tulipano G, Spillmann D, Tanghetti E, Oreste P, Zoppetti G, et al. Multiple interactions of HIV-I Tat protein with size-defined heparin oligosaccharides. *The Journal of biological chemistry*. 1999; 274:28198-205.

109. Ziegler A, Seelig J. Binding and clustering of glycosaminoglycans: a common property of mono- and multivalent cell-penetrating compounds. *Biophysical journal*. 2008; 94:2142-9.

110. David G. Integral membrane heparan sulfate proteoglycans. *FASEB journal* : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology. 1993; 7:1023-30.

