

大豆胰蛋白酶抑制劑之抗氧化能力 分析

Antioxidative Activity of Kunitz-type Trypsin Inhibitor Isolated from Soybean (*Glycine max*)

洪志宏 ^{*1}Chih-Hung Hung

元培科技大學醫學檢驗生物技術系

蔡慧思 ²Hui-Szu Tsai

台北榮總病理檢驗部

黃兆君 ¹Chou-Chun Huang

元培科技大學醫學檢驗生物技術系

王淑芬 ²Shu-Fen Wang

台北榮總病理檢驗部

蔡文翔 ¹Wein-Shiang Tsai

元培科技大學醫學檢驗生物技術系

王海龍 ¹Hai-Lung Wang

元培科技大學醫學檢驗生物技術系

¹ Department of Medical Technology, Yuanpei University of Science and Technology

² Department of Pathology & Laboratory Medicine

(Received, June 10, 2008; Revised, August 5, 2008; Accepted, November 11, 2008)

摘要：自由基常會引起老化作用、心血管疾病、癌症、阿茲海莫症等退化性疾病。大豆(soybean, *Glycine max*)，是世界普遍食用的一種食物，特別是在亞洲國家。最近研究發現，多食用大豆食品，可降低罹患骨質疏鬆(osteoporosis)、一些慢性疾病、心血管疾病及癌症。本實驗由大豆種子中分離出Kunitz-type胰蛋白酶抑制劑(Kunitz-type soybean trypsin inhibitor; SBTI)，發現其具有抗氧化能力，在試管(in vitro)試驗中，探討其對活性氧(reactive oxygen species, $O_2^{\cdot-}$, $\cdot OH$ 及 H_2O_2)及DPPH自由基的清除能力，結果清除 $O_2^{\cdot-}$ 自由基的 IC_{50} 為 $27.49 \pm 2.75 \mu g/ml$ ，清除 $\cdot OH$ 自由基的 IC_{50} 為 $1.48 \pm 0.15 mg/ml$ 清除 H_2O_2 的 IC_{50} 為 $2.47 \pm 0.25 mg/ml$ ，但對DPPH自由基的清除能力較弱。由結果得知，大豆Kunitz-type SBTI對活性氧具有清除的能力，特別對於清除 $O_2^{\cdot-}$ 自由基的能力最強。

* Corresponding author



關鍵詞：自由基、Kunitz-type 胰蛋白酶抑制劑、抗氧化能力、活性氧

Abstract: Reactive oxygen species and free-radical-mediated reactions have been reported in degenerative or pathological processes such as aging, cancer, coronary heart disease, and Alzheimer's disease. Meanwhile, there are many epidemiological data revealing an association between people who have a diet rich in soybean foods and a decrease in the risk of cardiovascular diseases and certain forms of cancer. In the present study, a Kunitz-type soybean trypsin inhibitor (SBTI) was isolated from soybean seed was evaluated for its in vitro scavenging effects on reactive oxygen species ($O_2^{\cdot-}$, OH, and H_2O_2) and DPPH radical. In scavenging assays the Kunitz-type SBTI showed to be effective against all the assayed reactive oxygen species, specially for $O_2^{\cdot-}$ ($IC_{50} = 27.49 \pm 2.75 \mu g/ml$), OH ($IC_{50} = 1.48 \pm 0.15 \text{ mg/ml}$), H_2O_2 ($IC_{50} = 2.47 \pm 0.25 \text{ mg/ml}$), but displayed weak activity in the DPPH assay. These results provide scientific support for the empirical use Kunitz-type SBTI, one of the soybean seed storage proteins, may play a role as an antioxidant and may be beneficial to health when it is consumed.

Key words: Free radical, Kunitz-type SBTI, Antioxidative activity, Reactive oxygen species

壹、前 言

大豆(soybean)，屬於豆目(Liguminales)，是世界普遍食用的一種食物，特別是在亞洲國家。最近研究發現，多食用大豆食品，可降低罹患骨質疏鬆(osteoporosis)、一些慢性疾病、心血管疾病及癌症¹。流行病學及動物實驗得知，多食用大豆食品可降低罹患前列腺癌^{2,3}、乳癌^{4,5}、及子宮頸癌⁶。大豆所含成份中，具有抗癌活性的除了大豆胰蛋白酶抑制劑之外，尚有大豆皂素(saponins)、大豆固醇(soy β -sitosterol)、大豆異黃酮(soy isoflavones)⁷等。

由大豆種子所分離的胰蛋白酶抑制劑(soybean trypsin inhibitor)，簡稱 SBTI。胰蛋白酶抑制劑在大豆中的各部位均有分佈，但主要存在於大豆的種子中。大豆種子中胰蛋白酶抑制劑的含量可達總蛋白的 6%~8%。胰蛋白酶抑制劑是分子量較小的、具有生理活性的功能性蛋白質，其生理功能除了作為種子貯藏蛋白，調節內源蛋白酶的活性以外，更重要的是具有保護種子不受昆蟲和病原菌等的侵害^{8,9}。大豆中胰蛋白酶抑制劑可分為兩類：第一類，Kunitz-type 胰蛋白酶抑制劑。分子量為 21 kD，含有二對雙硫鍵，主要對胰蛋白酶直接、專一地作用，這類抑制劑與胰蛋白酶的結合是定量地進行的，即 1 分子的抑制劑可以結合 1 分子的胰蛋白酶；第二類為 Bowman Birk-type 胰蛋白酶抑制劑，分子量約為 8 kD，含較多雙硫鍵，可分別與胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶結合，由於抑制劑分子內有兩個活化位置(active sites)，故被稱為雙頭抑制¹⁰。Bowman Birk-type 胰蛋白酶抑制劑比 Kunitz-type 胰蛋白酶抑制劑對熱、酸、鹼的穩定性強，當在乾燥狀態、105 °C 加熱或用其 0.02% 水溶性在 100°C 加熱 10min，仍可保持它們的活性。



大豆中的胰蛋白酶抑制剂屬於絲胺酸蛋白酶抑制剂(serine protease inhibitors)，它可以和胰腺分泌的絲胺酸蛋白酶發生反應，胰蛋白酶抑制剂與靶酶相互作用，通常如酶與受質之間的相互作用一樣，屬於互補型作用機制。兩者反應時，抑制剂暴露在外的活化位置與靶酶的活化位置透過氫鍵相連接，形成穩定的複合物，從而導致酶活化位置的閉鎖，使靶酶的活性喪失，與通常的酶催化反應相比，胰蛋白酶與抑制剂之間反應的米氏常數很低，故胰蛋白酶與抑制剂的親和力大，二者可以迅速結合形成複合物。Bowman Birk-type 胰蛋白酶抑制剂，已發現它能抑制結腸、肺、胰臟、口腔、食道、皮膚和膀胱的腫瘤形成¹¹⁻¹⁴，但它的生化及分子作用機轉需進一步的探討。Kunitz-type 胰蛋白酶抑制剂這類的研究資料相對較少。

自由基為人體新陳代謝過程產生的副產物，為帶有不成對電子的分子、原子或離子。因具有不成對電子的特性，以致於具有高度反應性。自由基可分為活性氧(reactive oxygen species)及活性氮(reactive nitrogen species)，其中多數以活性氧為主，包括超氧自由基($O_2^{\cdot-}$)、氫氧自由基($\cdot OH$)等。 $O_2^{\cdot-}$ 亦為活性氧之基礎反應產物。活性氧極易與細胞內的脂質、蛋白質、DNA及RNA等生物分子發生作用，並破壞這些分子的結構與正常的生化功能，其中對DNA的破壞最易造成基因的突變而導致如癌症之類的疾病發生。除此之外，活性氧並可破壞胞膜系統的磷脂質，造成通透性的改變或有害物質的堆積；也可使蛋白質變性，失去應有的生理功能⁵。

自由基會引起老化作用¹⁶及退化性慢性疾病：如關節炎、糖尿病、關節變硬、循環系統疾病、肝硬化、心臟病、動脈硬化、攝護腺病、癌症、帕金森氏病、老年癡呆症、皮膚起皺紋等老化現象等¹⁷⁻²⁰。細胞膜主要由脂肪及蛋白所組成，容易受到自由基侵襲，若沒有適度的保護，則細胞膜易破損，接著自由基攻擊細胞侵入了細胞核，若攻擊細胞核的基因，則造成基因突變(mutation)生成癌症。

此研究主要探討由大豆中所分離出的Kunitz-type SBTI是否具有清除自由基作用的能力，進而達到預防動脈硬化及癌症等疾病的生成。首先，我們先從大豆種子中純化Kunitz-type SBTI，探討其對活性氧($O_2^{\cdot-}$ 、 $\cdot OH$ 與 H_2O_2)及DPPH自由基清除能力，將可提昇大豆的價值與應用。

貳、研究方法

一、Kunitz-type SBTI 的分離和純化

稱取大豆種子 100 克，洗淨並除去雜質，浸泡於 1 升 0.01M, pH 8.0 的磷酸鹽緩衝液中，4⁰C 下靜置過夜。隔天於 4⁰C 的冷房下，進行下列步驟：用果汁機(waring blender)打成漿狀，靜置 2-3 小時，以萃取 SBTI。用 Beckman J2-21 M/E 冷凍離心機，在 4⁰C 以 10,000 rpm (JA-14 rotor)離心 15 分鐘，紗布過濾取上清液，慢慢加入固體硫酸銨至 70%飽和濃度，待沈澱生成達穩定之後，在以 10,000 rpm 離心 20 分鐘，所得沈澱，用少許蒸餾水溶後，移置透析袋，於 4⁰C 下，對 0.1N 醋酸透析 48 小時，並換 4 次透析液。以 18,000 rpm 離心 15 分鐘除去不溶之雜質，上清液通過預先以 0.01M Tris-HCl buffer 平衡過的 DE-52 cellulose 管柱(4.5 X 16 公分)，分別以含 0.1M、0.2M 氯化鈉之 Tris-HCl buffer 為沖洗液，以 Pharmacia fraction collector 每 10 分鐘收一管每管 6 毫升，其流速為每小時 36 毫升。測其波長為 280nm 紫外光的吸收，



可得三個蛋白的吸收峰，經活性測定後，知第三個蛋白峰具有胰蛋白酶抑制劑的活性。收集此吸收峰的蛋白質溶液，對蒸餾水透析 36 小時，並換三次透析液，調 pH 至 8 左右，離心，取上清液通入以 0.01M，pH 8.0 的磷酸鹽緩衝液平衡過的 Sephadex G-75 (2.7 X 100 公分)，以磷酸鹽緩衝液沖洗，可得二個吸收峰，經活性分析之第二個吸收峰具有活性。將有活性部分通過 trypsin-Sepharose-4B affinity column(2.2X 20 公分)，先以含 0.2N 氯化鈉，0.01M，pH 8.0 磷酸鹽緩衝液沖洗，將非特異性結合的蛋白質除去，最後用含有 0.2N 氯化鈉，0.01N 鹽酸溶液沖洗，可得一個蛋白吸收峰，此即所欲純化的 Kunitz-type SBTI，其純度可由 SDS-PAGE 決定。

二、活性氧清除能力分析

使用體外抗氧化活性(*in vitro* antioxidative activity; AOA)實驗方法，分析 Kunitz-type SBTI 的抗氧化能力，來計算出相對的抗氧化效價。本實驗主要以 Kunitz-type SBTI 對 superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$)、hydroxyl radical($\cdot OH$) 及 hydrogen peroxide (H_2O_2) 三種自由基抗氧化能力的表現。

(a)測定抗 Superoxide 自由基氧化之方法^{21,22}

將四種試劑 2.0 mM lucigenin (1.0ml)、phosphate-buffered saline, pH 7.4 (1.0ml)、1.0 M arginine (0.05ml)和 1.4 μM methylglyoxal (0.05ml)混合均勻後(共 2.1 ml)加入化學冷光分析儀(BJL uwCL analyzer)之圓底石英比色測定管中(該超微弱化學冷光分析儀的敏感度高達 $3.3 \times 10^{-15} W/cm^2$ 。每日的敏感度校正是利用 ^{14}C 為光源，在 860 ~ 867 伏特電壓下每秒產生 10,000 光子量，且其再現性的誤差小於 1.0%)。將 lucigenin、methylglyoxal 與 arginine 加入化學冷光分析儀之圓底石英比色測定管後 12 分鐘(720 秒)，分別加入 10 μl 0.5 mg/ml 的 Kunitz-type SBTI 後，可觀察到突然間不同程度冷光量的減弱，這個現象就是 Kunitz-type SBTI 具有不同程度的抗氧化表現。IC₅₀，係指 Kunitz-type SBTI 抗氧化物能抑制 50% superoxide 的濃度，其操作方式是先求得不同濃度的 Kunitz-type SBTI 抗氧化物其抑制冷光的量，再換算出 Kunitz-type SBTI 其 IC₅₀ 的濃度。

(b)測定 Hydroxyl radical ($\cdot OH$)之方法^{23,24}

利用 Fenton reaction 原理($Fe^{2+} + H_2O_2$)，將四種試劑：3 μM IBG (先溶於 pH 7.4 的 phosphate-buffered saline, 1.0 ml)、1.0 mM $FeSO_4$ (0.1 ml)、3% H_2O_2 (1.6ml)及 10 mM EDTA (0.05ml)，混合均勻後(共 2.75 ml)加入化學冷光分析儀之圓底石英比色測定管中。上述四種試劑的添加順序為 EDTA、IBG、 H_2O_2 最後為 $FeSO_4$ 。將 IBG 與 Fenton reagent ($H_2O_2 + Fe^{2+}$)加入化學冷光分析儀之圓底石英比色測定管後，18 分鐘(1,080 秒)，分別加入 10 μl 0.5 mg/ml 的 Kunitz-type SBTI 後，可觀察到突然間不同程度冷光量的減弱，利用上述方法，亦可求出 Kunitz-type SBTI 其 IC₅₀ 的濃度。

(c)測定 Hydrogen peroxide (H_2O_2)之方法^{25,26}

將三種試劑 2 mM luminol (無須冷凍，保存於 4°C，內含 sodium borate, pH 7.3, 1.0 ml)、PBS, pH 7.4 (1.0 ml)、及 1.2% H_2O_2 (每日新鮮配製，1.0 ml)，混合均勻後(共 3.00 ml)加入化學冷光分析儀之圓底石英比色測定管中。利用 BJL 化學冷光分析儀測量其冷光量。將 Luminol



與 H₂O₂ 加入化學冷光分析儀之圓底石英比色測定管後 10 分鐘(600 秒)，分別加入 10 μl 0.5 mg/ml 的 Kunitz-type SBTI 後，可觀察到突然間不同程度冷光量的減弱，利用上述方法，亦可求出 Kunitz-type SBTI 其 IC₅₀ 的濃度。

三、抗氧化能力分析

以 DPPH [1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical; 2, 2-diphenyl-1 (2, 4, 6-trinitro-phenyl)hydrazyl] method 檢測 Kunitz-type SBT 提供氫原子的能力²⁷。將 10 mM DPPH Stock Solution 以甲醇稀釋成 0.2 mM DPPH solution。取 20 μl 連續序列稀釋之樣品，分別加入 200 μl 0.2 mM DPPH solution，於室溫下反應 5 分鐘後，以 540 nm 檢測吸光值。吸光值愈低表示清除能力愈強。以下列公式計算自由基清除功效：

Scavenging effect % (capacity to scavenging the DPPH radical)

$$= [1 - (A_{\text{sample}} - A_{s0}) / (A_{\text{control}} - A_{c0})] \times 100\%$$

A_{sample}: 樣品加入 DPPH 之吸光值; A_{s0}: 樣品不含 DPPH 之吸光值; A_{control}: 稀釋液加入 DPPH 之吸光值; A_{c0}: 稀釋液不含 DPPH 之吸光值。

四、統計分析

本實驗結果所有數據均採用平均值±標準誤差(mean standard error)表示，每次比較的差異性，依實驗性質採用 pair-test 或 ANOVA，比較結果時當 P<0.05 方具有統計意義。

參、實驗結果

一、Kunitz-type SBTI 純化：

本研究主要利用 trypsin-Sepharose 4B 親和性管柱來純化 Kunitz-type SBTI，由 100 克種子純化出約 15.0 毫克的 Kunitz-type SBTI。取 100 克的大豆種子洗淨並除去雜質，經由硫酸銨分割後，活性介於 70-95%。沉澱物經透析、離心，將上清液通過 DE-52 cellulose 管柱(4.5 X 10 公分)，Sephadex G-75 (2.7 X 100 公分) 及 Trypsin-Sepharose 4B 親合性管柱 (2.2 X 5 公分)，即可將 Kunitz-type SBTI 純化，其純度及分子量可由 SDS-PAGE 分析(圖 1)。



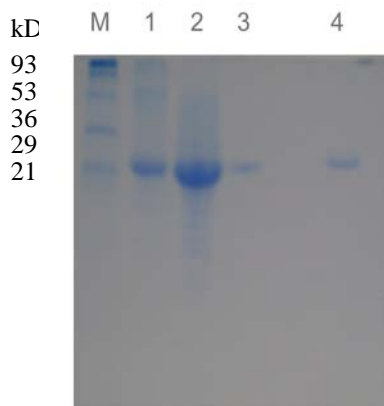
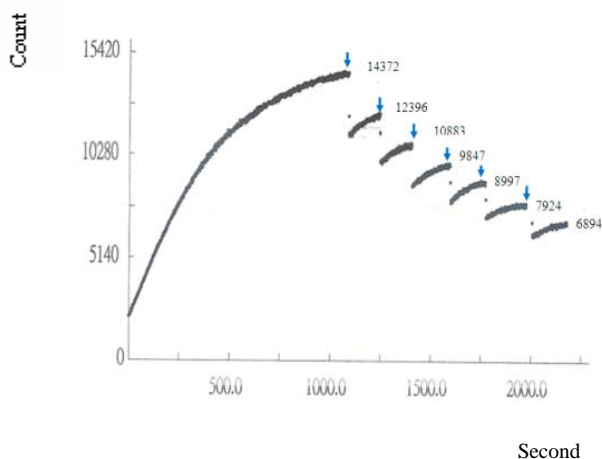


圖1 15% SDS-PAGE電泳分析。Lane 1: 粗萃取液；Lane 2: 通入DEAE管柱，具有活性部分；Lane 3: 通過trypsin-Sepharose 4B 親合性管柱；Lane 4: 以5% 2-mercaptoethanol處理 Kunitz-type SBTI；Lane M: 標準蛋白質分子量。

二、Kunitz-type SBTI 清除自由基能力分析

清除自由基能力分析是利用純化學反應製造出各種高自由基濃度的環境，藉由加入受測物評估其清除自由基的能力，在實驗中我們測試 Kunitz-type SBTI 對於環境中常見 $O_2^{\cdot -}$ 、 $\cdot OH$ 二種自由基與 H_2O_2 的清除能力。圖二發現 Kunitz-type SBTI 清除 $O_2^{\cdot -}$ 之 IC_{50} 為： $27.49 \pm 2.75 \mu g/ml$ 。由圖三，發現 Kunitz-type SBTI 清除 $\cdot OH$ 之 IC_{50} 為： $1.48 \pm 0.15 mg/ml$ 。由圖四發現桑 SBTI 清除 H_2O_2 之 IC_{50} 為： $2.47 \pm 0.25 mg/ml$ 。每個實驗樣品濃度，重複三次。

(a)



(b)

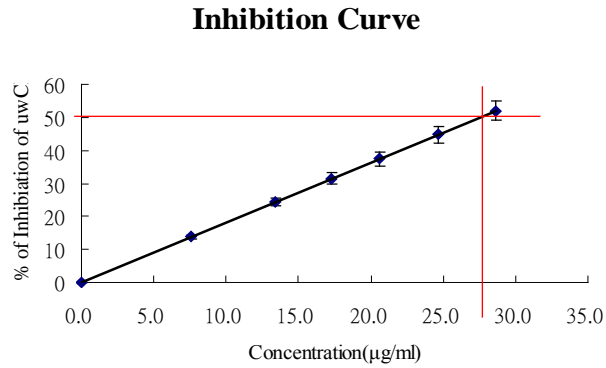
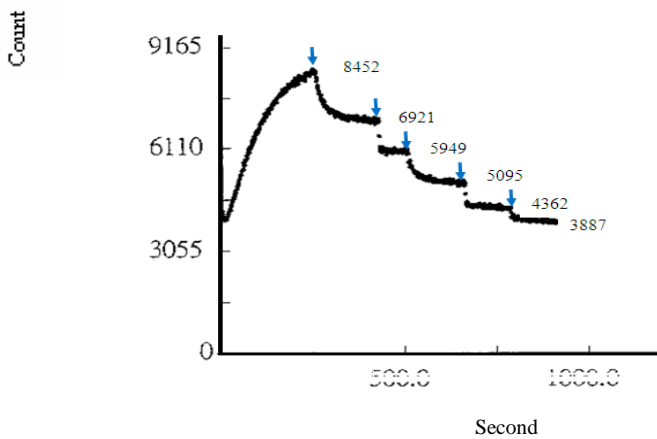


圖 2 Kunitz-type SBTI 清除 $O_2^{\cdot-}$ 自由基活性分析：(a)箭頭所指示加入 10 μ l 0.5 mg/ml Kunitz-type SBTI 之處，可觀察到冷光會突然減弱。(b)Kunitz-type SBTI 的濃度為 X 軸，冷光抑制百分比為 Y 軸，可做成一抑制曲線，Kunitz-type SBTI 濃度與抑制冷光之相關性為 $R^2=0.9934$ ，且計算出 Kunitz-type SBTI 清除 $O_2^{\cdot-}$ 自由基之 IC_{50} 為： 27.49 ± 2.75 μ g/ml。

(a)



(b)

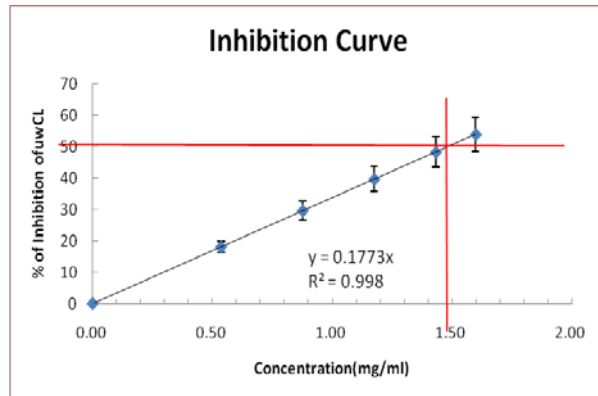
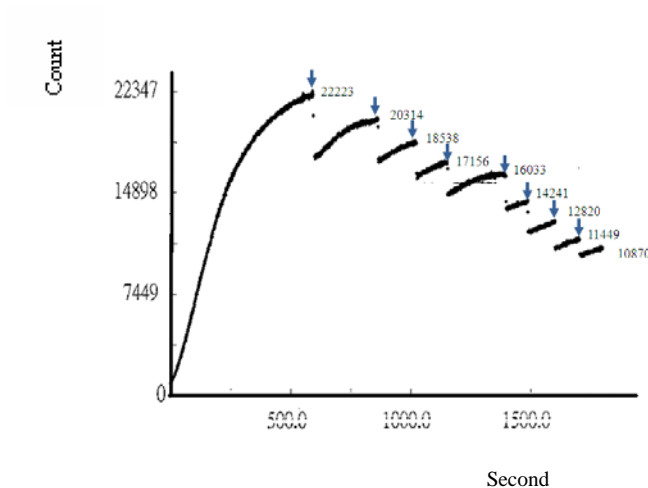


圖 3 Kunitz-type SBTI 清除 OH 自由基活性分析：(a)箭頭所指示是加入 10 μ l 0.5 mg/ml Kunitz-type SBTI 之處，可觀察到冷光會突然減弱。(b). Kunitz-type SBTI 濃度為 X 軸，冷光抑制百分比為 Y 軸，可做成一抑制曲線，Kunitz-type SBTI 濃度與抑制冷光之相關性為 $R^2=0.998$ 且計算出 Kunitz-type SBTI 清除 OH 自由基之 IC_{50} 為： 1.48 ± 0.15 mg/ml。

(a)



(b)

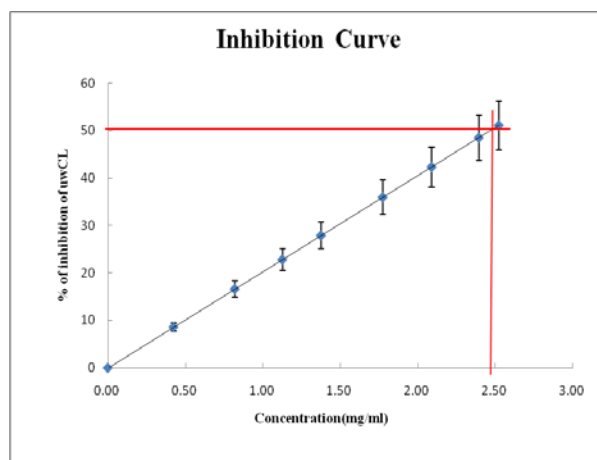


圖 4 Kunitz-type SBTI 清除 H₂O₂ 活性分析：(a).箭頭所指示是加入 10 μ l 0.5 mg/ml Kunitz-type SBTI 之處，發現冷光會突然減弱。(b)Kunitz-type SBTI 濃度為 X 軸，冷光抑制百分比為 Y 軸，可做成一抑制曲線，Kunitz-type SBTI 與抑制冷光之相關性為 $R^2=0.997$ ，且計算出 Kunitz-type SBTI 清除 H₂O₂ 之 IC₅₀ 為： 2.47 ± 0.25 mg/ml。

三、抗氧化能力分析

Kunitz-type SBTI 對 DPPH 清除能力，在濃度 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 2.5 mg/ml 時，分別為 $3.5\% \pm 0.25\%$, $8.5\% \pm 0.65\%$, $12.5\% \pm 1.25\%$, $16.7\% \pm 1.35\%$, $22\% \pm 3.05\%$ ，顯示 Kunitz-type SBTI 對清除 DPPH 的能力很弱。

肆、討 論

本研究主要利用經由硫酸銨分割，DE-52 cellulose 管柱，Sephadex G-75 及 Trypsin-Sepharose 4B 親和性管柱來純化 Kunitz-type SBTI，由 100 克種子純化出約 15.0 毫克的 Kunitz-type SBTI，由酵素活性分析，產率約為 14%，其純度及分子量可由 SDS-PAGE 分析。

在甘薯塊根中，已分離出一種分子量為 33 kDa，具有胰蛋白酶抑制劑活性的貯藏性蛋白質²⁸，並具有抗氧化的能力。而我們發現 Kunitz-type SBTI 對於 O₂^{•-}、OH 二種自由基和 H₂O₂ 都有具有清除的能力，尤其對清除 O₂^{•-} 自由基的能力最佳(其 IC₅₀ 為 $27.49 \pm 2.75\mu$ g/ml，而 OH IC₅₀ 為 1.48 ± 0.15 mg/ml 及 H₂O₂ IC₅₀ 為 2.47 ± 0.25 mg/ml)。

人類是必須在有氧環境下才能生存，但是體內在執行氧化代謝時，常會產生自由基；自由基本種類繁多，其中活性氧 ROS (reactive oxygen species) 佔人體自由基比例高。許多現代的「致命疾病」如心臟血管疾病、癌症、過敏症、糖尿病及關節炎等慢性病，都可能起因於體



內過量的自由基和它們所造成的連鎖反應。人體常見能清除自由基的包括超氧化歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、麩胱甘肽過氧化酶 (Glutathione Peroxidase, GPx)、過氧化氫酶 (catalase)，將自由基先代謝成毒性較低的 H_2O_2 ，再代謝成無毒的 H_2O 。內生性抗氧化作用遍佈細胞內及胞外，全面保護人體免受自由基的破壞。除了這些酵素外，我們還可以由飲食中攝取如維他命 A、C、E、 β -胡蘿蔔素及硒等天然的抗氧化物質，以協助體內清除自由基。蔬菜水果中也含有許多其它的抗氧化物質，這些物質被稱為自然的植物營養素或植物化學成份 (phytochemicals)，例如黃酮類 (flavonoids)、吲哚類 (indoles)、大豆中的金雀異黃素 (genistein)、番茄紅素 (lycopene)、多酚類及甘薯根 (sweet potato root)²⁹、山藥塊莖 (yam tuber)³⁰、山藥 (yam mucilages)³¹ 及馬鈴薯塊莖 (potato tuber) 中的儲藏性蛋白。

大豆所含成份中，大豆皂素 (saponins)、大豆固醇 (soy β -sitosterol)、大豆異黃酮 (soy isoflavones)⁸ 都具有抗氧化、抗發炎和抗凝血能力，在這裡我們也證實 Kunitz-type SBTI 也具有清除自由基的能力，因此多食用大豆食品能做為國人預防心血管相關疾病及抗癌之健康保健食品。

參考文獻

1. McCue, P. and Shetty, K., "Health Benefits of Soy Isoflavonoids and Strategies for Enhancement: A Review," *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, Vol. 44, 2004, pp. 361-367.
2. Jacobsen, B. K., Knutsen, S. F. and Fraser, G.E., "Does High Soy Milk Intake Reduce Prostate Cancer Incidence? The Adventist Health Study (United States)," *Cancer Causes Control*, Vol. 9, 1998, pp. 553-557.
3. Lee, M. M., Gomez, S. L., Chang, J. S., Wey, M., Wang, R. T. and Hsing, A. W., "Soy and Isoflavone Consumption in Relation to Prostate Cancer Risk in China," *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, Vol. 12, 2003, pp. 665-668.
4. Dai, Q., Franke, A. A., Jin, F., Shu, X. O., Hehert, J. R., Custer, L. J., Cheng, J., Gao, Y. T. and Zheng, W., "Urinary Excretion of Phytoestrogens and Risk of Breast Cancer among Chinese Women in Shanghai," *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, Vol. 11, 2002, pp. 815-821.
5. Yamamoto, S., Sobue, T., Kobayashi, M., Sasaki, S. and Tsugane, S., "Soy, Isoflavones, and Breast Cancer Risk in Japan," *Journal of National Cancer Institute*, Vol. 95, 2003, pp. 906-913.
6. Goodman, M. T., Wilkens, L. R., Hankin, J. H., Lyu, L. C., Wu, A. H. and Kolonel, L. N., "Association of Soy and Fiber Consumption with the Risk of Endometrial Cancer," *American Journal of Epidemiology*, Vol. 146, 1997, pp. 294-306.
7. Messina, M. and Barnes, S., "The Role of Soy Products in Reducing the Risk of Cancer,"



- Journal of National. Cancer Institute*, Vol. 83, 1991, pp. 541-546.
8. Haruta, M., Major, I. T., Christopher, M. E., Patton, J. J. and Constabel, M., "A Kunitz Trypsin Inhibitor Gene Family from Trembling Aspen (*Populus tremuloides Michx.*): Cloning, Functional Expression, and Induction by Wounding and Herbivory," *Plant Molecular Biology*, Vol. 46, 2001, pp. 347-359.
 9. Baldwin, I. T., "Jasmonate-induced Response are Costly but Benefit Plants under Attack in Native Populations," *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, Vol. 95, 1998, pp. 8113-8118.
 10. Richardson, M., In *Methods in Plant Biochemistry*, Dey, P. M. and Harborne, J. B., eds.; Academic Press, New York, Vol. 5, 1991.
 11. Kennedy, A.R., "The Bowman-Birk Inhibitor from Soybeans as an Anticarcinogenic Agent," *American Journal of Clinical Nutrition.*, Vol. 68, 1998, pp. 1406S-1412S.
 12. Lin, J.Y., Hsieh, Y.S. and Chu, S.C., "Chimeric Protein: Abrin B Chain-trypsin Inhibitor Conjugate as A New Antitumor Agent," *Biochemistry International*, Vol. 19, 1989, pp. 313-323.
 13. Armstrong, W. B., Kennedy, A. R., Wan, X. S., Taylor, T. H., Nguyen, Q. A., Jensen, J., Thompson, W., Lagerberg, W. and Meyskens, F. L. Jr., "Clinical Modulation of Oral Leukoplakia and Protease Activity by Bowman-Birk Inhibitor Concentrate in A Phase IIa Chemoprevention Trial," *Clinical of Cancer Research*, Vol. 6, 2000, pp. 4684-4691.
 14. Inoescu, J. G., Weber, D. and Bradford, R., "Clinical Applications of Free Radical Assessment in Blood, Serum, and Plasma Sample by Enhance Chemiluminescence II. Antioxidative Activity and Therapy Approaches with Drugs and Natural Compounds," *Journal of Biomedical & Laboratory Sciences*; Vol. 12, 2000, pp. 46-56.
 15. 趙克然、楊毅軍、曹道俊、胡淼琳，*氧自由基與臨床（初版）*，台灣：合記出版社，民國 91 年。
 16. Harman, D., "Role of Antioxidant Nutrients in Aging: Overview," *Age*, Vol. 18, 1995, pp. 51-62.
 17. Ames, B. N., "Dietary Carcinogens and Anticarcinogens: Oxygen Radicals and Degenerative Diseases," *Science*, Vol. 221, 1983, pp. 1256-1264.
 18. Gey, K. F., "The Antioxidant Hypothesis of Cardiovascular Disease: Epidemiology and Mechanisms," *Biochemistry Society transactions*, Vol. 18, 1990, pp. 1041-1045.
 19. Diaz, M. N.; Frei, B., Vita, J. A. and Keaney, J. F., "Antioxidants and Atherosclerotic Heart Disease." *New England Journal of Medicine*, Vol. 337, 1997, pp. 408-416.
 20. Smith, M. A., Perry, G., Richey, P. L., Sayre, L. M., Anderson, V. E., Beal, M. F. and Kowal, N., "Oxidative Damage in Alzheimer's." *Nature*, Vol. 382, 1996, pp. 120-121.
 21. Inoescu, J. G., Weber, D. and Bradford, R., "Clinical Application of Free Radical Assessment



- in Blood and Serum Samples by Enhanced Chemiluminescence I. Methodology and Results in Different Clinical Conditions.” *Journal of Biomedical & Laboratory Sciences*, Vol. 11, 1999, pp. 103-109.
22. Tsai, C. H., Chang, R. C., Chiou, J. F. and Liu, T. Z., “Improved Superoxide-generating System Suitable for the Assessment of the Superoxide-scavenging Ability of Aqueous Extracts of Food Constituents Using Ultraweak Chemiluminescence,” *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, Vol. 51, 2003, pp. 58-62.
 23. Tsai, C. H., Arnold, S., Chiou, J. F., Chern, C. L. and Liu, T. Z., “Rapid and Specific Detection of Hydroxyl Radical Using an Ultraweak Chemiluminescence Analyzer and a Low-level Chemiluminescence Emitter: Application to Hydroxyl Radical-scavenging Ability of Aqueous Extracts of Food Constituents,” *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, Vol. 49, 2001, pp. 2137-2141.
 24. Chiou, J. F., Kao, C. Y. and Chen, S. H., “Ultra-weak Chemiluminescence Analysis on the Mechanism of Producing and Releasing Nitric Oxide in PMA-stimulated Macrophage,” *Journal of Biomedical & Laboratory Sciences*, Vol. 12, 2000, pp. 89-94.
 25. Ionescu, G., Merk, M. and Bradford, R., “Simple Chemiluminescence Assays for Free Radicals in Venous Blood and Serum Samples: Results in Atopic, Psoriasis, MCS and Cancer Patients,” *Research in Complex Medical*, Vol. 6, 1999, pp. 294-300.
 26. Mariana, D. A. and Winrich, B., “Glycated Proteins can Enhance Photooxidative Stress in Aged and Diabetic Lenses,” *Free Radical Research*, Vol. 36, 2002, pp. 1251-1259.
 27. Brand-Williams, W., Cuvelier, M. C. and Berset, C., “Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity,” *Technology*, Vol. 28, 1995, pp. 25-30.
 28. Hou, W. C., Chen, Y. C., Chen, H. J., Lin, Y. H., Yang, L. L. and Lee, M. H., “Antioxidant Activities of Trypsin Inhibitor, A 33 KDa Root Storage Protein of Sweet Potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam cv. Tainong 57),” *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, Vol. 49, 2001, pp. 2978-2981.
 29. Hou, W. C., Han, C. H., Chen, H. J. and Wen, C. L., “Storage Proteins of Two Cultivars of Sweet Potato (*Ipomoea Batatas* L.) and Their Protease Hydrolysates Exhibited Antioxidant Activity in Vitro,” *Plant Science*, Vol. 168, 2005, pp. 449-456.
 30. Hou, W. C., Lee, M. H., Chen, H. J., Liang, W. L., Han, C. H. and Liu, Y. W., “Antioxidant Activities of Dioscorin, the Storage Protein of Yam (*Dioscorea batatas* Decne) Tuber,” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 49, 2001, pp. 4956-4960.
 31. Hou, W. C., Hsu, F. L. and Lee, M. H., “Yam (*Dioscorea batatas* Decne) Tuber Mucilage Exhibited Antioxidant Activities in Vitro,” *Planta Medica*, Vol. 68, 2002, pp. 1072-1076.

