

相思樹胰蛋白酶抑制劑抑制大腸直腸癌細胞侵入轉移能力

Inhibition of Invasion in Human Colon Adenocarcinoma Cells by *Acacia confusa* Trypsin Inhibitor

洪志宏^{1*} Chih-Hung Hung
元培科技大學醫學檢驗生物技術系

吳佳貞¹ Chia-Chen Wu
元培科技大學醫學檢驗生物技術系

王海龍¹ Hai-Lung Wang
元培科技大學醫學檢驗生物技術系

¹Department of Medical Laboratory Science and Biotechnology, Yuanpei University

摘要：本篇是由相思樹(*Acacia confusa*)種子所分離的胰蛋白酶抑制劑(*Acacia confusa* trypsin inhibitor)，簡稱ACTI，屬於Kunitz-type的胰蛋白酶抑制劑。以不同濃度的ACTI處理HT-29大腸直腸癌細胞，利用MTT試驗觀察細胞的存活率，以12.5 μM ACTI處理細胞48小時後，細胞的存活率下降至 $43.3 \pm 3\%$ ，在72小時後更可以下降至 $34.6 \pm 2.5\%$ 。所以HT-29細胞的存活率隨著處理ACTI的劑量及時間的增加而下降。在軟性瓊膠群落生長試驗 (soft agar colony growth assay)中，處理5 μM ACTI兩星期後，觀察群落之生成與型態，發現細胞群落聚集的現象有明顯的降低，只剩下 $38 \pm 3\%$ 。利用侵入能力試驗(invasion test)，ACTI在濃度5 μM 處理細胞48小時後，抑制HT-29侵入性的能力達到 $48 \pm 5\%$ ，再利用明膠蛋白酶電泳法(gelatin zymography)可明顯觀察到在濃度5 μM ACTI處理細胞48小時後，可以抑制HT-29 cells分泌表現MMP-2及MMP-9的量，特別是MMP-9更明顯。因此ACTI抑制HT-29大腸直腸癌細胞侵入性的能力，可能經由抑制MMP-2及MMP-9的分泌表現量。故本研究闡釋ACTI有潛力發展成臨床抑制細胞轉移能力的藥劑。

關鍵字：相思樹胰蛋白酶抑制劑、MMP-2、MMP-9

Abstract: *Acacia confusa* trypsin inhibitor (ACTI) is a Kunitz family 2-chain trypsin inhibitor with anMr of 19.4 kD. The cytotoxic effects of ACTI on human colon cancer cells (HT-29) have been demonstrated, but the exact mechanism by which ACTI induces these effects is not completely understood. In this study, we found that ACTI inhibited the growth of HT-29 cells in a time- and concentration-dependent manner based on MTT test results. A soft agar colony growth assay revealed

*Corresponding author



that the number of colonies decreased with increasing concentrations of ACTI. To confirm the effects of ACTI, an invasion assay was conducted. Treating HT-29 cells with up to 5 μ M of ACTI decreased cell invasion significantly—by 48% \pm 5% for 48 h. Gelatin zymography assay results revealed that ACTI exerted a significant inhibitory effect on the MMP-9 activity of HT-29 cells, but only slightly reduced MMP-2 activity. The results suggested that ACTI suppression of the invasive ability of colorectal cancer HT-29 cells might involve its inhibition of the expression of MMP-2 and MMP-9. Our results indicated that ACTI has potential in the clinical treatment of cancer metastasis.

Keywords: ACTI; Human colon cancer cells; Cell invasion

1. 前言

基底膜 (basement membranes)和細胞外間質(extracellular matrix ; ECM)被降解，是癌細胞產生侵入性或是轉移現象的重要的指標。當細胞要從組織侵襲或轉移至其他部位時，會利用淋巴或血液而擴散至其他器官，因此癌細胞會先分泌蛋白酶，將基底膜及細胞外間質降解之後，再開始向其他器官轉移 (Westermarck and Kahari, 1999)。在癌細胞的侵入能力方面，matrix metalloproteinases (MMPs)扮演了很重要的角色，MMP 家族是一種 zinc-dependent endopeptidases，其可降解細胞外間質(ECM)。MMP family 在生理學方面，對於組織型態、組織修復及血管新生方面皆有重大的影響，而病理學方面，過度的降解 ECM 會造成關節炎、骨關節炎、牙周炎以及腫瘤的侵入和轉移。因此 MMP 家族的表現量異常將會造成嚴重的影響(Nagase and Woessner, 1998; Nagase and Woessner, 1999)。

研究指出在大鼠模式當中，可以發現乳癌轉移至腦癌的案例，MMP-2、MMP-9 和 MMP-3 的表現量有明顯上升，因此在複雜的轉移侵襲過程當中 MMP 扮演著重要的角色(Mendes, 2005; Prasad et al., 2013)。且有研究指出在卵巢癌的細胞當中，MMP-2 及 MMP-9 的表現量會增加，且 urokinase plasminogen activator (uPA)也同樣上升，且與癌細胞的轉移和侵入性皆有重大的相關性 (Schmalfeldt et al., 2001)；另外在肺癌細胞中也有發現，uPA 和 MMP-9 的表現量增加，並參與著細胞的侵入以及轉移的作用(Yang et al., 2005; Kim et al., 2014)。因此，可以知道 MMP 的表現量上升的確會與癌症細胞的轉移有關，要抑制癌細胞的轉移或是侵入的能力，主要就是要抑制會分解細胞外間質的 MMP 家族，所以尋找抑制這些蛋白質的物質就成為目前極具意義的工作。已有研究證實在前列腺癌細胞當中，抑制 matrix proteinases 即可抑制癌細胞的轉移作用(Desrosiers et al. 2005)；也有研究指出抑制 uPA 以及 MMP-9 可以抑制肺癌細胞的轉移、侵襲以及腫瘤的生長(Rao et al., 2005)。因此可以更加確定抑制 MMP 家族可以抑制癌症細胞的侵襲以及轉移的能力。

有研究指出利用稻米中萃取出來的 Bowman-Birk inhibitor 可抑制 pro-MMP-1 的表現，及大豆中的 Bowman-Birk inhibitor 也可抑制 pro-MMP-9 的表現量(Bawadi et al., 2005)，因此可知胰蛋白酶抑制劑對於 MMP 具有抑制的能力；另外有研究指出，大豆胰蛋白酶抑制劑抑制癌細胞的侵入能力，主要抑制 mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway 訊息傳遞路徑，因而抑制 MMP 及 uPA 的表現(Chen et al., 2005)，或藉由抑制 MAPK 導致癌症細胞的凋亡。另有研究顯示大豆胰蛋白酶抑制劑藉由抑制 MAPK pathway 導致 uPA 的表現下降而使細胞侵入性降低(Yang et al., 2006)。



本論文主要是研究相思樹種子所萃取出的胰蛋白酶抑制劑(*Acacia confusa* trypsin inhibitor ; ACTI)對於 HT-29 大腸直腸癌細胞的影響。相思樹(*Acacia confusa*)屬於豆目 (Leguminales)，含羞草科 (Mimosidae)，相思樹屬 (*Acacia*)。由相思樹種子所分離出來的胰蛋白酶抑制劑(ACTI)，其是由 A 鏈及 B 鏈以兩對雙硫鍵連結所組成的蛋白質，A 鏈含 136 個胺基酸，B 鏈含 39 個胺基酸，分子量 19.4 kDa，屬於 Kunitz-type 的抑制劑 (Lin et al., 1991; Wu et al., 1993)。

首先，以不同濃度的 ACTI 處理 HT-29 大腸直腸癌細胞，利用 MTT 試驗觀察細胞的存活率，再利用侵入性試驗(invasion test)觀察 ACTI 是否抑制癌細胞的侵入能力，接著利用明膠蛋白酶素電泳法(gelatin zymography)的方式觀察 ACTI 是否會抑制 HT-29 分泌產生 MMP-2 及 MMP-9 的量。

2. 研究方法

2.1 ACTI 之萃取

秤取相思樹種子 200 克(採自元培科技大學附近丘陵地生長之相思樹)，洗淨並除去雜質，浸泡於 1 公升 0.01M, pH 8.0 的磷酸鹽緩衝液中，4°C 下靜置過夜。之後利用果汁機將其打成漿狀，靜置 2-3 小時，利用 KUBOTA 7700 冷凍離心機，在 4°C 以 10,000 rpm (AG-2506 rotor)離心 15 分鐘，取上清液，慢慢加入固體硫酸銨至 50%的濃度，4°C 以 10,000 rpm 離心 30 分鐘，取上清液，再慢慢加入固體硫酸銨至 90%濃度，4°C 以 10,000 rpm 離心 30 分鐘離心，將沉澱物移置透析袋，於 4°C 下，對 0.01M pH 8.0 的磷酸鹽緩衝液透析 48 小時，期間換 4 次透析液。透析後，以 4°C 12,000 rpm 離心 20 分鐘除去不溶的沉澱物，取上清液通過預先以 0.01M pH 8.0 的磷酸鹽緩衝液平衡過的 Sephadex G-50 (1.5 × 90 公分)管柱，以 0.01M pH 8.0 的磷酸鹽緩衝液為沖洗液，以分液收集器收每管 5ml，每管測量波長 280 nm 紫外光的吸收及活性，將具有抑制胰蛋白酶活性的部份，通入以 0.01M, pH 8.0 的磷酸鹽緩衝液平衡過的 DEAE-cellulose 管柱(4.5 × 10 公分)，先以上述的磷酸鹽緩衝液沖洗出無法附著於管柱上的蛋白質，再以 0 至 0.2 N 的氯化鈉直線階梯 (linear salt gradient)沖洗。將具有活性的試管收集，直接通過 trypsin-Sepharose 4B 親和性管柱(2.2 × 20 公分)，先以 0.1 N 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 0.1 N 氯化鈉，0.01N HCl 溶液沖提，可得到一個具有活性的蛋白吸收峰，此即所欲純化的 ACTI，其純度可由 SDS-PAGE 決定(Lin et al., 1991)。

2.2 ACTI 活性測定

實驗組是將 0.5 毫升溶於 0.01M Tris-HCl, pH 8.0 緩衝溶液中的定量 ACTI 與 0.5 毫升 trypsin 溶液 (10mg/ml) 混合均勻，置於 37°C 5 分鐘後，再加入 4 微升 BAPNA (N-benzoyl-DL-arginyl-p-nitroanilide)溶液(50mg/ml)，37°C 反應 20 分鐘後，加入 0.5 毫升 10%醋酸溶液終止反應，測定 410 nm 吸收。對照組則以 0.5 毫升磷酸鹽緩衝液代替 ACTI 溶液，其餘步驟與實驗組相同。空白組是以 0.5 毫升 ACTI 溶液(實驗空白組)或 0.5 毫升磷酸鹽緩衝液 (對照組空白組)依序加入 0.5 毫升 trypsin 溶液，1 毫升 10%醋酸，再加入 4 微升 BAPNA 溶液，測定 410 nm 的吸光(Wu et al., 1993)。

2.3 細胞培養

將人類大腸直腸癌細胞 HT-29 (ATCC, Manassas, VA, USA)。使用含 10% 胎牛血清(fetal



52 相思樹胰蛋白酶抑制劑抑制大腸直腸癌細胞侵入轉移能力

bovine serum; FBS; 購自 JRH biosciences, Inc., Cat. No. 12203-500M) 和 抗 生 素 (antibiotic-antimycotic; 購自 Gibco Co., Cat. No. 15240-062) 的 RPMI 1640 培養基(Gibco BRL), 在含 5% CO₂ 及飽和水蒸氣的 37°C 培養箱中培養, 且每 72~96 小時更換一次培養液, 並於 confluence 時做次培養。培養期間定期以倒立顯微鏡觀察細胞形態之完整性及生長速度。

2.4 MTT assay

MTT assay 常被運用於檢測細胞增殖、存活率或毒性試驗。主要是依賴活細胞粒線體內之琥珀酸去氫酶 (succinate dehydrogenases), 能將黃色 MTT [3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] 還原成紫色的脂溶性 MTT formazan 且堆積在細胞中, 再以 DMSO 溶解並測其吸光值, 所以當活細胞越多時, 吸光值會越高。培養過的細胞, 吸去培養基後, 分別加入 200 μ l MTT 溶液 (濃度為 0.5 mg/mL), 於培養箱中反應 4 小時後, 再加入 200 μ l DMSO (dimethyl sulfoxide) 反應 5 分鐘, 以溶解細胞, 使用 ELISA reader 在 570 nm 讀取吸收光度, 並以未加 ACTI 處理的細胞之吸光值為對照組, 並以含 ACTI (2.5、5、7.5、10 和 12.5 μ M) 處理的細胞之吸光值除以未加 ACTI 對照組之吸光值, 計算出細胞之相對百分比 (Green et al., 1984)。每個實驗樣品濃度, 重複三次。

2.5 軟性瓊膠群落生長試驗

此試驗在 6 孔盤中培養, 分為三層, 由下層至上層分別為: 滋養層、固定層及保溼層。滋養層為 1 ml (0.5% agarose、10% 胎牛血清的 RPMI 培養基)/盤, 接著將 1×10^3 細胞/盤固定在固定層 (含 0.3% agarose、10% 胎牛血清的 RPMI 培養基) 1 ml 後, 再加入含有不同濃度的 ACTI 10% 胎牛血清 RPMI 培養液 1ml 當作保溼層, 置於 37°C 5% CO₂ 的培養箱, 培養一個星期後, 加入 1ml RPMI 含 10% 胎牛血清培養基, 再放置培養箱一個星期, 加入 0.005% 結晶紫 0.5ml 染色, 即可在顯微鏡下計算群落數。每個實驗樣品濃度, 重複三次。

2.6 細胞侵入能力之試驗

利用 Neuro Probe Inc. 出產的博登細胞移行器 (Boyden chamber), 先將下層的 bottom chamber 加入 22 μ l RPMI 含 10% FBS 培養液, 組合 Boyden chamber, 由下至上組裝的順序為 bottom chamber、polycarbonate membranes、橡膠片和 up chamber, 並將螺絲鎖緊。在 up chamber 加入 10 μ l matrix gel (0.2 mg/ml) (BD Biosciences), 放置無菌操作台 4 小時待其凝固。取 5×10^4 cells 至每個 well 中, 約 50 μ l (已含不同濃度 ACTI), 放置於 37°C, 5% CO₂ 培養箱, 培養 48 小時。48 小時之後取出 polycarbonate membranes, 使用預冷的 95% 乙醇固定下層細胞 10 分鐘, 待乾。下層細胞利用結晶紫染色 30 分鐘, 以 PBS 沖洗, 再利用棉花棒沾酒精將上層未侵入的細胞刮去, 於顯微鏡下 (200X) 隨機選視野, 選出 3 個視野並計算細胞數目。

2.7 明膠蛋白酶電泳法

取 1×10^6 cells 置於 24 孔培養盤中, 培養隔夜後。將含有 10% FBS 的 RPMI 培養基抽乾, 使用不含血清的 RPMI 培養液沖洗一次, 加入不含血清 200 μ l/孔 (去除血清中內含之 MMP 的干擾) 的 RPMI 培養液並同時添加不同濃度 (0, 2.5 以及 5 μ M) 的 ACTI 之後, 培養 48 小時後,



吸取培養液，以 Bio-Rad Protein Assay 定量蛋白，依此結果來作為培養基中蛋白的定量值。以含有 0.1% gelatin 的 8% SDS-PAGE gel 進行電泳分析。把之前所取之培養基與 5×染劑(0.1% SDS、104 mM Tris-HCl pH 6.8、50% glycerol、0.125% bromophenol blue)均勻混合注入膠瑣中跑電泳。在電泳結束後以 washing buffer (40mM Tris-HCl pH 8.5、0.2M NaCl、10mM CaCl₂、2.5% Triton X-100)在室溫下沖洗 30min 2 次，然後加入 reaction buffer (40mM Tris-HCl pH 8.5、0.2M NaCl、10mM CaCl₂、0.01% NaN₃)在 37°C 恆溫箱中反應 12hr，最後反應完之膠片以 Coomassie blue (0.2% Coomassie blue R-250、50% 甲醇、10% 醋酸)染色 30min，再以褪色液(10% 醋酸和 20% 甲醇)褪染。

2.8 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。

3. 結果

3.1 ACTI 之純化

ACTI 的純化方法是先將相思樹的種子洗淨，以 0.01M，pH 8.0 的磷酸鹽緩衝液浸泡，利用果汁機將種子打成泥狀，以利萃取蛋白質。所得到之粗萃取液，利用 50 至 90% 的硫酸銨濃度進行鹽析分割。將 50 至 90% 硫酸銨濃度離心沉澱所得到的蛋白質對 0.01M，pH 8.0 的磷酸鹽緩衝液作透析。透析後，經離心所得上清液，通過 Sephadex G-50 管柱，利用此管柱分離不同分子量的蛋白質，並以 OD280 測定，可得到二個吸收峰(圖 1、A)。第二個吸收峰具有胰蛋白酶抑制劑活性，故將具有活性的第二個吸收峰通過 DEAE-cellulose 管柱，接著以含 0 至 0.2N 氯化鈉濃度梯度之 0.01M 磷酸鹽緩衝液 pH 8.0，沖出蛋白質，結果僅得到單一個吸收峰且具有活性(圖 1、B)，將此部分，再通入 trypsin-Sepharose 4B 親和性管柱。此管柱先以 0.01M 磷酸鹽緩衝液，pH 8.0 含 0.1N 氯化鈉平衡，樣品通入管柱之後再以上述緩衝液將非特異性結合的蛋白沖出，最後以 0.01N pH 2.0HCl 溶液，將 ACTI 沖出(圖 1、C)，其具有蛋白酶抑制劑活性。

接著利用 15% SDS-PAGE 分析，可得到分子量約 20kDa 均質化的蛋白質(圖一、D)。



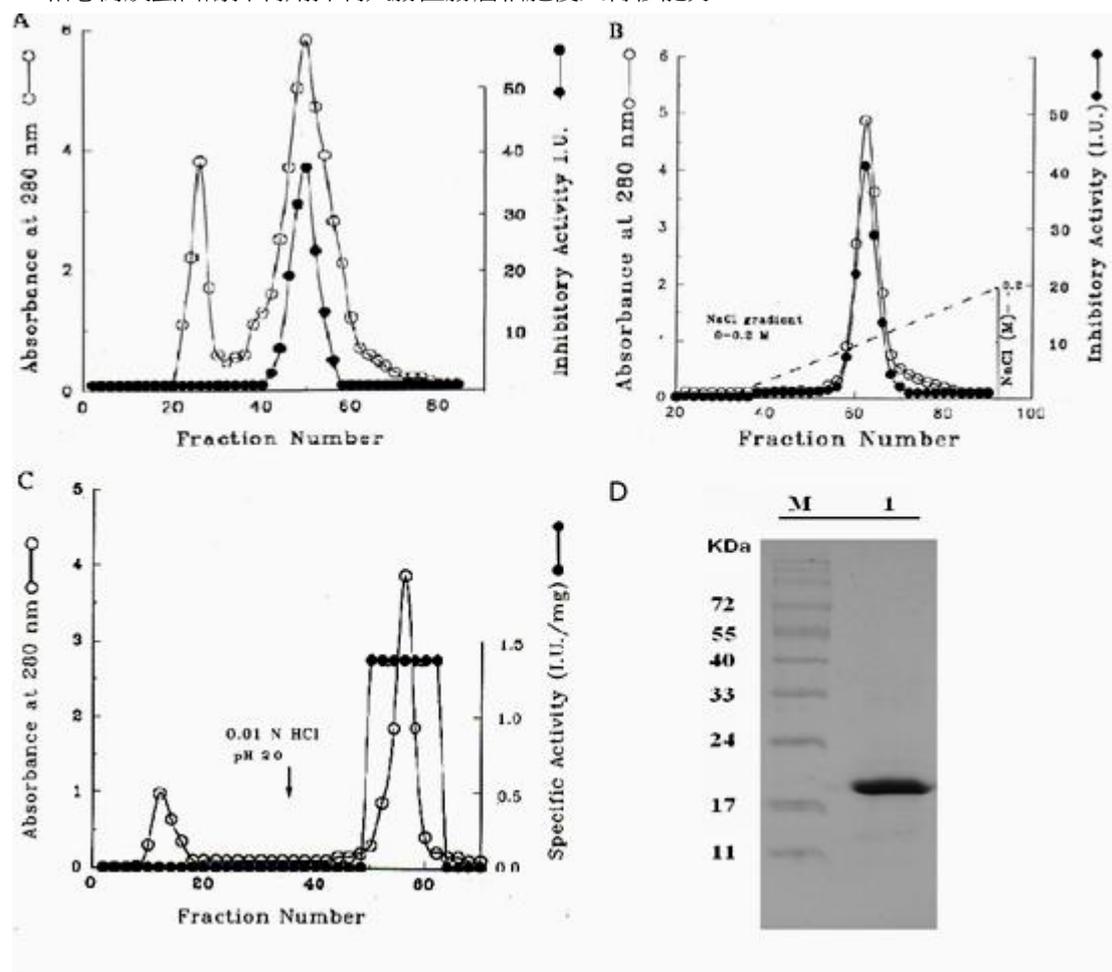


圖 1 ACTI 之純化。(A)相思樹種子粗萃取液通過凝膠過濾法(Sephadex G-50, 1.5 × 90 公分), 收集具有抑制胰蛋白酶活性的第二個吸收峰, 接著利用 DEAE cellulose 離子交換管柱色層分析法 (B), 先以 0.01M, pH 8.0 的磷酸鹽緩衝液平衡 DEAE cellulose 管柱(4.5 × 10 公分), 以含 0 到 0.2 M 氯化鈉離子梯度之 0.01M, pH 8.0 的磷酸鹽緩衝液為沖洗液, 可得一個 OD₂₈₀ 吸收峰, 經活性測定後, 其具有胰蛋白酶抑制劑的活性。(C)將有活性部分通過 trypsin-Sepharose 4B 親和性管柱 (2.2 × 20 公分), 先以含 0.1N 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 ACTI 可被 0.01N HCl 溶液沖出。(D)利用 15% SDS-PAGE 電泳分析。Lane M: 標準蛋白質分子量, Lane 1: trypsin-Sepharose 4B 親和性管柱所純化的 ACTI。

3.2 ACTI 對 HT-29 cells 生長之影響---細胞毒性試驗

利用 MTT assay 來偵測 ACTI 對於 HT-29 cells 存活率的影響。結果顯示在處理 ACTI 48 小時後, 可發現隨著 ACTI 濃度增加, 細胞的存活率逐漸減少, 濃度在 12.5 μ M 時細胞的存活率下降至 43 \pm 3%, 且在 72 小時之後更可以使細胞存活率下降至 34.6 \pm 2.5 % (圖 2)。由此得知, 隨著處理 ACTI 的濃度及時間的增加, 會降低 HT-29 cells 的存活率。



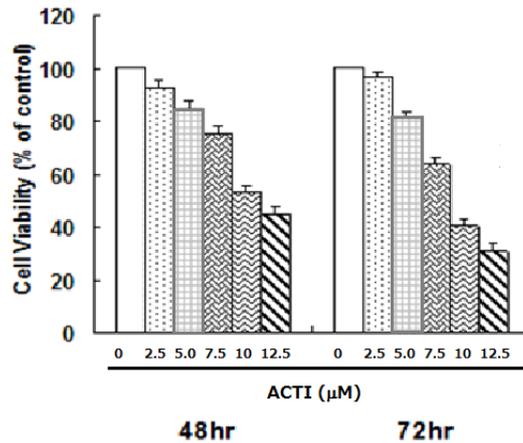


圖2 利用 MTT assay 檢測 ACTI 對 HT-29cell 之細胞毒性分析。將 HT-29cell 細胞量為 2.5×10^3 cells /well 次培養到 96 孔盤中，細胞，培養於 37°C 5% CO₂ 16 小時使細胞附著，以不同濃度 ACTI (0、2.5、5、7.5、10 和 12.5 μM)處理細胞 48 及 72 小時，以 ELISA reader 在 570nm 測吸光值，每個濃度進行三重複。各濃度 ACTI 吸光值與濃度 0 μM 吸光值比較，計算細胞相對量百分比。

3.3 ACTI 對 HT-29 cells 生長之影響---軟性瓊膠群落生長試驗 (soft agar growth assay)

由 MTT assay 可得知 ACTI 會影響 HT-29 cells 的存活率，因此利用與腫瘤形成最相關的軟性瓊膠群落生長試驗，來測試 ACTI 是否會抑制腫瘤的形成。將細胞固定在軟性瓊膠當中，細胞若會生長，在兩個星期後，細胞則會形成群落，在圖 3 的結果中，細胞經過 2.5 及 5 μM ACTI 處理後，群落數只有未經處理的 89 ± 6 % 及 38 ± 3 %。因此可知處理 5 μM ACTI 可以顯著地抑制 HT-29 cells 增生形成群落。

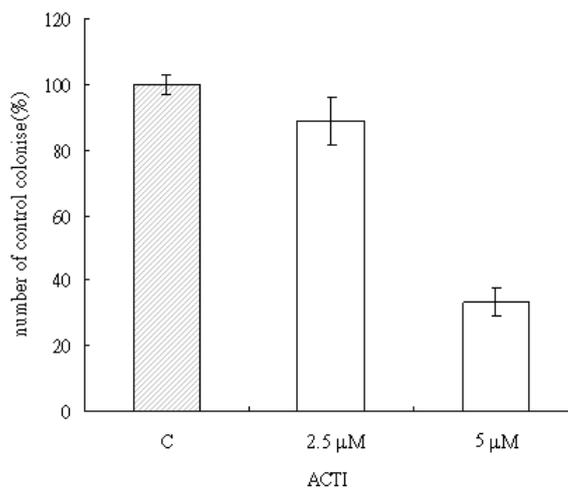


圖 3 ACTI 對 HT-29 cells 在軟性瓊膠群落生長之影響。HT-29 cells 培養在 6 孔盤中，內含 0.3% agarose 及 10% FBS 的 RPMI 培養基，以 2.5 及 5 μM ACTI 處理一星期後，再加入含 10% FBS 的 RPMI 培養基 1 ml。一星期後可計算群落數。每個實驗樣品濃度，重複三次。



3.4 ACTI 對於 HT-29 cells 侵入能力之影響

我們利用 matrix gel 模擬生物體中的細胞外間質，matrix gel 主要成分有 laminin, collagen I, growth factors 以及其他蛋白分解酵素的化合物所組成，當 HT-29 cells 所分泌的 proteases 降解 matrix gel 時，則代表著細胞開始慢慢進行侵襲或轉移至其他地方，因此本實驗主要觀察 ACTI 是否會抑制 HT-29 cells 分泌 proteases 的量，進一步抑制 HT-29 cells 分解 matrix gel，而降低 HT-29 cells 的侵入能力。在圖 4 的結果當中可以觀察到，處理 2.5 和 5 μ M ACTI 48 小時後，計算侵入細胞數目，可知濃度在 2.5 μ M ACTI 時，侵入的細胞數有明顯的減少，抑制細胞的侵入能力達 $48 \pm 5\%$ ，顯示 ACTI 具有抑制 HT-29 cells 的侵入能力。

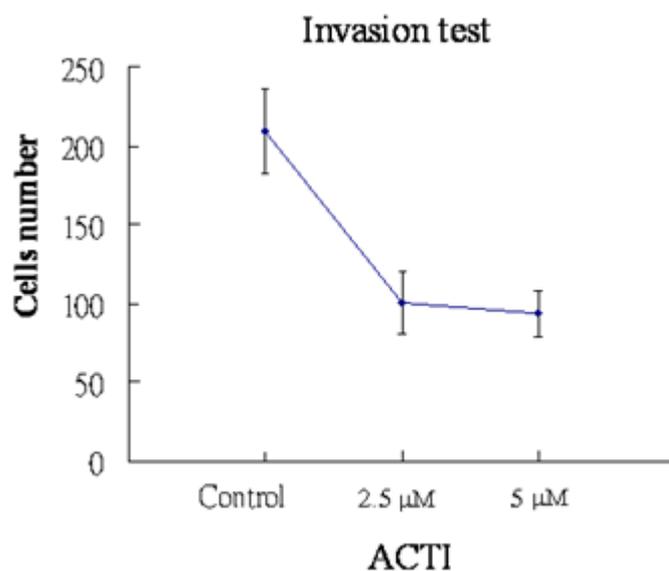


圖 4 ACTI 對 HT-29 cells 侵入性之影響。取 5×10^4 cells 至每個 well 中，體積約 50 μ l (含不同濃度 ACTI)，放置於 37°C，5% CO₂ 培養箱，培養 48 小時。之後取出 polycarbonate membranes，使用預冷的 95% 乙醇固定下層細胞，結晶紫染色，以 PBS 沖洗，再利用棉花棒沾酒精將上層未侵入的細胞刮去，於顯微鏡下 (200X) 隨機選視野，選出 3 個視野並計算細胞數目。

3.5 ACTI 抑制 HT-29 cells 之 MMP-2 和 MMP-9 的蛋白質表現量

由侵入能力實驗得知，ACTI 可抑制 HT-29 cells 的侵入能力，細胞的侵入能力與細胞所分泌的 MMP 家族有很大的相關性，其中又以 MMP-2 和 MMP-9 為最主要的相關家族 (Mook et al., 2004)。利用明膠蛋白酶電泳法的方法來觀察 MMP-2 和 MMP-9 在培養基中的表現量，圖 5 中可以觀察到細胞處理 2.5 及 5 μ M ACTI 48 小時後，可明顯地抑制 MMP-9 的表現量，但 MMP-2 較無明顯下降。因此 ACTI 抑制 HT-29 cell 的侵入能力，可能主要是經由抑制 MMP-9 的表現量相關。



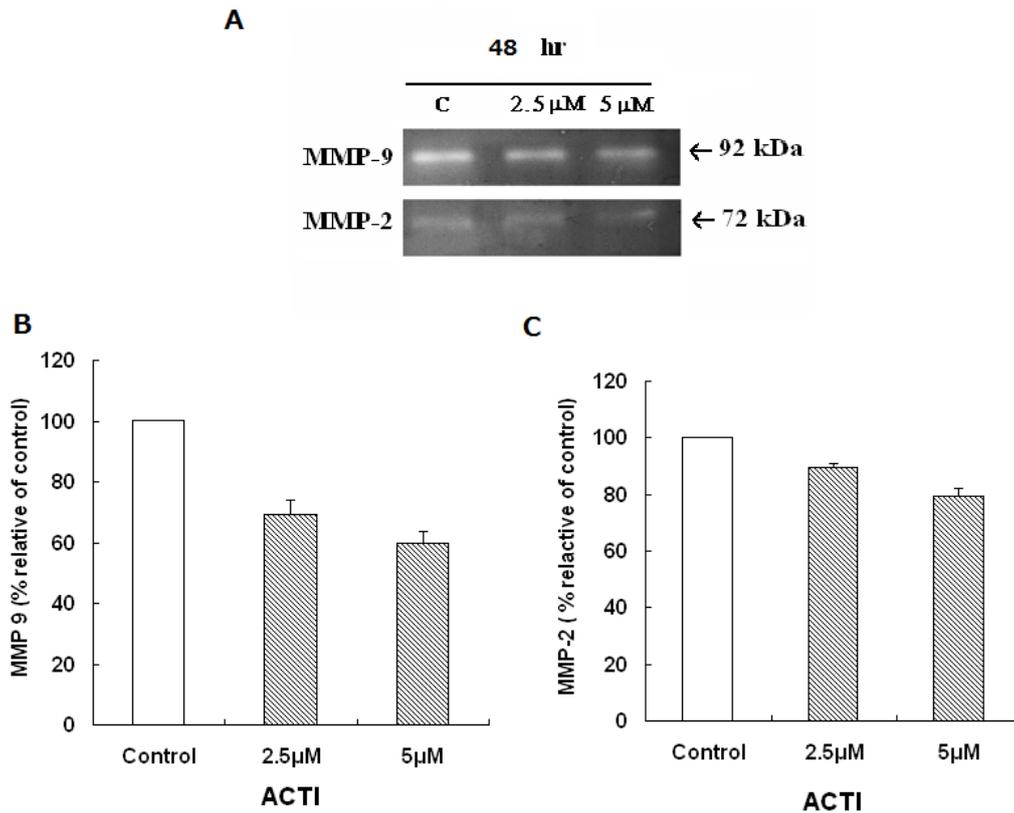


圖 5 利用明膠蛋白酶電泳法分析 ACTI 對 HT-29 cells 分泌表現 MMP-2 及 MMP-9 活性之影響。(A)以濃度為 2.5 及 5 μM 的 ACTI 處理 HT-29 cells 48 hr 後，培養基利用含有 0.1% gelatin 的 8% SDS-PAGE gel 電泳，進行明膠蛋白酶電泳法分析培養基中 MMP-2 及 MMP-9 的活性。(B)MMP-9 及(C)MMP-2 活性分別藉由 densitometry 定量。

4. 討論

蛋白酶抑制劑(protase inhibitor)廣泛存在於動物界(例如：血液、胰臟)、植物界(例如：豆科植物)以及微生物界(例如：*steptomycetes*)當中。其中絲氨酸蛋白酶抑制劑(serine protease inhibitor)普遍存在於豆科類的種子當中。胰蛋白酶抑制劑(trypsin inhibitor)是屬於一種絲氨酸型蛋白酶抑制劑(serine protease inhibitor)，依照序列與特性分為：Kunitz type、Bowman-Birk type、Potato I、Potato II、Squash 以及 Cereal super 等幾個家族(Batista et al., 1996)。由植物種子所分離的胰蛋白酶抑制劑，依分子量大小及半胱氨酸含量，可分成較常見的二大類，一種是 Bowman-Birk type inhibitor 家族，分子量較小，約 8 至 10 kDa，含有高量的半胱氨酸，每 100 個胺基酸中即含 20 個半胱氨酸，並且通常可形成 7-8 對雙硫鍵。另一種是 Kunitz type inhibitor 家族，以大豆胰蛋白酶抑制劑(soybean trypsin inhibitor)為代表，分子量約 18 至 24 kDa，半胱氨酸的含量很低，約 100 個胺基酸中，含二個半胱氨酸，通常具有一條或兩條的多勝肽鏈並可形成兩對雙硫鍵(Wang and Ng, 2006)。ACTI 是屬於 Kunitz type inhibitor 家族，具有兩條多勝肽鏈。

本研究是利用相思樹胰蛋白酶抑制劑(*Acacia confusa* trypsin inhibitor；ACTI)探討ACTI對 HT-29大腸直腸癌細胞的影響，主要是在探討ACTI抑制HT-29 cells的侵入轉移能力。首先觀察



ACTI是否會對HT-29 cells的存活造成影響，利用MTT assay的方法，觀察細胞的存活率，明顯看到隨著ACTI濃度上升會造成細胞的存活率下降，在ACTI處理HT-29 48小時後，可以發現隨著ACTI濃度增加，細胞的存活率逐漸減少。接著利用軟性瓊膠群落生長試驗來探討ACTI對於腫瘤形成是否具有抑制的效果。細胞要長成群落通常需要數十顆細胞在一起才會慢慢形成群落，因此本實驗是將HT-29 cells固定在0.3%的agarose當中，細胞若有生長的能力即可形成群落，結果ACTI的確有抑制細胞生長及群落形成的效果。接著探討ACTI是否會抑制HT-29 cells的侵入能力，本實驗主要是以Boyden chamber來進行細胞的侵入分析，結果顯示ACTI能有效抑制具有侵入能力的HT-29細胞的轉移。細胞的移動性包括細胞骨架的改變、細胞表面貼附的能力，同時也是決定了癌細胞在轉移的過程中，是否能順利到達目標器官。結果證實了，當細胞處理ACTI 2.5 μ M後就可明顯觀察到抑制細胞的侵入能力。

在轉移擴散的癌細胞中，癌細胞藉由蛋白質水解酵素來分解細胞外基質，導致細胞與細胞間基質的分離，促使癌細胞具有移動性。由過去的文獻中指出，基質金屬蛋白水解酵素家族中的MMP-2 與MMP-9會被大量的表現在許多的惡性腫瘤中(Johnsen et al., 1998)，因此MMP-2與MMP-9的表現與癌細胞的轉移和侵入具有高度相關性 (Gialeli et al., 2011; Liabakk et al., 1996; Fink and Boratyński, 2012)。由於serum中含有大量的MMP-2和MMP-9，爲了排除serum 的干擾，於是實驗中採取serum starvation的方式以ACTI處理HT-29 cells，分析培養基中MMP活性，並以Bio-Rad定量蛋白濃度當細胞數定量的工具，以提高明膠蛋白酶電泳法的準確性。由實驗中證實了，當細胞處理高濃度的ACTI可以明顯抑制MMP-9活性的表現，並且有dose-dependent的現象；而MMP-2在此細胞株中，受到ACTI的影響較微量。因此我們推論ACTI可能是藉由抑制MMP-2和MMP-9的活性表現，而使HT-29 cells的侵入能力下降。在大豆胰蛋白酶抑制劑也發現，藉由抑制MAPK pathway，使uPA (urokinase plasminogen activator)(Inagaki et al., 2005)及MMP的表現量下降，導致的癌細胞侵入轉移能力降低有著相當大的關係(Dano et al., 2005)。

參考文獻

- [1] Batista, I. F., Oliva, M. L., Araujo, M. S., Sampaio, M. U., Richardson, M., Fritz, H. and Sampaio, C. A., "Primary Structure of a Kunitz-type Trypsin Inhibitor from *Enterolobium Contortisiliquum* Seeds," *Phytochemistry*, Vol. 41, 1996, pp. 1017-1022.
- [2] Bawadi, H. A., Antunes, T. M., Shih, F. and Losso, J. N., "In vitro Inhibition of the Activation of Pro-matrix Metalloproteinase 1 (pro-MMP-1) and Pro-matrix Metalloproteinase 9 (pro-MMP-9) by Rice and Soybean Bowman-Birk Inhibitors," *The Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 52, 2005, pp. 4730-4736.
- [3] Chen, P. N., Hsieh, Y. S., Chiou, H. L. and Chu, S. C., "Silibinin Inhibits Cell Invasion through Inactivation of Both PI3K-Akt and MAPK Signaling Pathways," *Chemico-Biological Interactions*, Vol. 156, 2005, pp. 141-150.
- [4] Dano, K., Behrendt, N., Hoyer-Hansen, G., Johnsen, M., Lund, L. R., Ploug, M. and Romer, J., "Plasminogen Activation and Cancer," *Thrombosis and Haemostasis*, Vol. 93, 2005, pp. 676-681.
- [5] Desrosiers, R. R., Cusson, M. H., Turcotte, S. and Beliveau, R., "Farnesyltransferase Inhibitor SCH-66336 Downregulates Secretion of Matrix Proteinases and Inhibits Carcinoma Cell



- Migration,” *The International Journal of Cancer*, Vol. 114, 2005, pp. 702-712.
- [6] Fink, K. and Boratyński, J., “The Role of Metalloproteinases in Modification of Extracellular Matrix in Invasive Tumor Growth, Metastasis and Angiogenesis,” *Postepy Higieny i Medycyny Doswiadczalnej*, Vol. 66, 2012, pp. 609-628.
- [7] Gialeli, C., Theocharis, A. D. and Karamanos N. K., “Roles of Matrix Metalloproteinases in Cancer Progression and Their Pharmacological Targetting,” *FEBS Journal.*, Vol. 278, 2011, pp. 16-27.
- [8] Green, L. M., Reade, J. L. and Ware, C. F., “Rapid Colorimetric Assay for Cell Viability: Application to the Quantitation of Cytotoxic and Growth Inhibitory Lymphokines,” *Journal of Immunology Methods*, Vol. 70, 1984, pp. 257-268.
- [9] Inagaki, K., Kobayashi, H., Yoshida, R., Kanada, Y., Fukuda, Y., Yagyu, T., Kondo, T., Kurita, N., Kitanaka, T., Yamada, Y., Sakamoto, Y., Suzuki, M., Kanayama, N. and Terao, T., “Suppression of Urokinase Expression and Invasion by a Soybean Kunitz Trypsin Inhibitor Are Mediated through Inhibition of Src-dependent Signaling Pathways,” *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 280, 2005, pp. 31428-31437.
- [10] Johnsen, M., Lundb, L. R., Rømer, J., Almholt, K. and Danø, K., “Cancer Invasion and Tissue Remodeling: Common Themes in Proteolytic Matrix Degradation,” *Current Opinion in Cell Biology*, Vol. 10, 1998, pp. 667-671.
- [11] Kim, A., Yim, N. H., Im, M., Jung, Y. P., Kim, T. and Ma, J. Y., “Suppression of the Invasive Potential of Highly Malignant Tumor Cells by KIOM-C, a Novel Herbal Medicine, via Inhibition of NF- κ B Activation and MMP-9 Expression,” *Oncology Reports*, Vol. 31, 2014, pp. 287-297.
- [12] Liabakk, N. B., Talbot, I., Smith, R. A., Wilkinson, K. and Balkwill, F., “Matrix Metalloprotease 2 (MMP-2) and Matrix Metalloprotease 9 (MMP-9) Type IV Collagenases in Colorectal Cancer,” *Cancer Research*, Vol. 56, 1996, pp. 190-196.
- [13] Lin, J. Y., Chu, S. C. Wu, H. C. and Hsieh, Y. S., “Trypsin Inhibitor from the Seeds of *Acacia confusa*,” *Journal of Biochemistry*, Vol. 110, 1991, pp. 879-883.
- [14] Mendes, O., Kim, H. T. and Stoica, G., “Expression of MMP2, MMP9 and MMP3 in Breast Cancer Brain Metastasis in a Rat Model,” *Clinical and Experimental Metastasis*, Vol. 22, 2005, pp. 237-246.
- [15] Mook, O. R., Frederiks, W. M. and Van Noorden, C. J., “The Role of Gelatinases in Colorectal Cancer Progression and Metastasis,” *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol. 1705, 2004, pp.69-89.
- [16] Nagase, H. and Woessner, J. F. Jr., “Matrix Metalloproteinases,” *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 274, 1999, pp. 21491-21494
- [17] Nagase, H. and Woessner, S. D., “Matrix Metalloproteinase Degradation of Extracellular Matrix: Biological Consequences,” *Current Opinion in Cell Biology*, Vol. 10, 1998, pp. 602-608.
- [18] Prasad, C. P., Chaurasiya, S. K. and Axelsson, L., “WNT-5A Triggers Cdc42 Activation Leading to an ERK1/2 Dependent Decrease in MMP9 Activity and Invasive Migration of Breast Cancer Cells,” *Molecular Oncology*, Vol. 7, 2013, pp. 870-883.



- [19] Rao, J. S., Gondi, C., Chetty, C., Chittivelu, S., Joseph, P. A. and Lakka, S. S., "Inhibition of Invasion, Angiogenesis, Tumor Growth, and Metastasis by Adenovirus-mediated Transfer of Antisense uPAR and MMP-9 in Non-small Cell Lung Cancer Cells," *Molecular Cancer Therapeutics*, Vol. 4, 2005, pp. 1399-1408.
- [20] Schmalfeldt, B., Prechtel, D., Harting, K., Spathe, K., Rutke, S., Konik, E., Fridman, R., Berger, U., Schmitt, M., Kuhn, W. and Lengyel, E., "Increased Expression of Matrix Metalloproteinases (MMP)-2, MMP-9, and the Urokinase-type Plasminogen Activator Is Associated with Progression from Benign to Advanced Ovarian Cancer," *Clinical Cancer Research*, Vol. 8, 2001, pp. 2396-2404.
- [21] Wang, H. X. and Ng, T. B., "Concurrent Isolation of a Kunitz-type Trypsin Inhibitor with Antifungal Activity and a Novel Lectin from *Pseudostellaria heterophylla* Roots," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 342, 2006, pp. 349-353.
- [22] Westermarck, J. and Kahari, V. M., "Regulation of Matrix Metalloproteinase Expression in Tumor Invasion," *FASEB Journal*, Vol. 13, 1999, pp. 781-792.
- [23] Wu, H. C. and Lin, J. Y., "The Complete Amino Acid Sequence of a Kunitz-type Trypsin Inhibitor from Seeds of *Acacia confusa*," *Journal of Biochemistry*, Vol. 113, 1993, pp. 258-263.
- [24] Yang, S. A., Paek, S. H., Kozukue, N., Lee, K. R. and Kim, J. A., "Alpha-chaconine, a Potato Glycoalkaloid, Induces Apoptosis of HT-29 Human Colon Cancer Cells through Caspase-3 Activation and Inhibition of ERK 1/2 Phosphorylation," *Food and Chemical Toxicology*, Vol. 44, 2006, pp. 839-846.
- [25] Yang, S. F., Hsieh, Y. S., Lin, C. L., Hsu, N. Y., Chiou, H. L., Chou, F. P. and Chu, S. C., "Increased Plasma Levels of Urokinase Plasminogen Activator and Matrix Metalloproteinase-9 in Nonsmall Cell Lung Cancer Patients," *Clinical Chimica Acta*, Vol. 354, 2005, pp. 91-99.

