

## 台灣欒樹胰蛋白酶抑制劑抑制大腸直腸 癌細胞生長之分析

### Inhibition of Growth in Human Colon Adenocarcinoma Cells by *Koelreuteria formosana* trypsin inhibitor

洪志宏 \* Chih-Hung Hung

董陳峰 Chen-Feng Dong

王海龍 Hai-Lung Wang

元培醫事科技大學醫學檢驗生物技術系

Department of Medical Laboratory Science and Biotechnology, Yuanpei University of Medical Technology

**摘要：**由台灣欒樹 (*Koelreuteria formosana*) 種子純化出胰蛋白酶抑制劑 (*Koelreuteria formosana* trypsin inhibitor)，簡稱 KFTI，其分子量約 19 kDa，由 12.3 kDa 及 6.7 kDa 兩條多肽鏈以雙硫鍵連接所組成，屬於 Kunitz type 蛋白酶抑制劑。KFTI 對大腸直腸癌細胞 (HT-29) 生長之影響以 MTT 試驗觀察其細胞存活率，實驗結果得知其有效濃度為 10  $\mu$ M 且反應 72 小時才有明顯作用，之後利用流式細胞儀以 annexin-V 染色觀察發現在 10  $\mu$ M 72 小時的 M2 (凋亡細胞) 有明顯上升 ( $p < 0.05$ )，顯示 KFTI 在 10  $\mu$ M 具有使 HT-29 細胞產生細胞凋亡的能力。以西方墨點試驗檢測細胞凋亡 (apoptosis) 相關蛋白如 caspase-3、PARP、Bax 等，發現 KFTI 會使得 HT-29 生長抑制是因誘導細胞走向細胞凋亡的路徑。

**關鍵字：**台灣欒樹胰蛋白酶抑制劑、Kunitz-type 蛋白酶抑制劑、細胞凋亡

**ABSTRACT:** A trypsin inhibitor (KFTI) was purified from the seed of *Koelreuteria formosana*. 15% SDS-PAGE analysis of KFTI revealed that it is constituted by two polypeptide chains (A-chain, Mr 12.3 kDa and B-chain, Mr 6.7 kDa), the molecular weight being ~19 kDa. The KFTI was found to be a thermostable Kunitz type protease inhibitors. KFTI is also conducted the experiment on the growth impact on cancerous cell of large intestine and rectum (HT-29). For instance, MTT is used to observe the survival rate of its cell, showing that the effective concentration has to be 10  $\mu$ M with 72 hours response before it can effect prominently. Afterward, flow cytometer will use annexin-V dye to observe if there is any prominent increase ( $p < 0.05$ ) with M2 (apoptosis) with 10  $\mu$ M in 72 hours, showing that KFTI has the capability to render HT-29 cell to generate apoptosis within in 10  $\mu$ M. Furthermore, western blot is exploited to test and examine related protein as caspase-3、PARP, and Bax regarding apoptosis, and it is found that the death results of cell is heading towards the path of apoptosis.

\* Corresponding author



**Keywords:** *Koelreuteria formosana* trypsin inhibitor、Kunitz-type protease inhibitor、apoptosis

## 1. 前言

為了保護自己免受昆蟲和其他草食動物的傷害，植物進化出各種防禦機制，如產生有毒的或抗營養的次級代謝產物和蛋白質 (Harborne, 1990; Felton and Duffey, 1991)，防禦機制會隨著植物品種的不同而改變，最常見的防禦蛋白質是蛋白酶抑制劑(PIS)。在草食昆蟲的消化道中發現蛋白酶抑制劑抑制蛋白水解酶，會導致過多消化酶分泌和必需胺基酸無法攝取，導致昆蟲生長被抑制。各種消化蛋白酶，包括絲胺酸、半胱胺酸、天門冬胺酸和金屬蛋白酶的抑制劑，已在植物中被發現 (Heitz et al., 1999)。絲胺酸蛋白酶抑制劑是最常見的，由許多蛋白質家族所組成，包括 potato inhibitors I 和 II、Bowman-Birk type inhibitors 及 Kunitz type inhibitors (Ryan, 1990; Richardson, 1991)。蛋白酶抑制劑當作防禦蛋白的功效已經藉由大量的研究證實，可對抗昆蟲、真菌、細菌及害蟲的攻擊 (Rufino et al., 2013; Haq et al., 2004; Dunaevsky et al., 2005; Lopes et al., 2009; Lima et al., 2011)。

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胺酸含量，可分成較常見的二大類，一種是 Bowman-Birk type 蛋白酶抑制劑家族，分子量較小，約 8 至 10 kDa，含有高量的半胱胺酸，每 100 個胺基酸中即含 20 個半胱胺酸，並且通常可形成 7-8 對雙硫鍵，大多數的胰蛋白酶抑制劑是屬於此型。另一種是 Kunitz type 蛋白酶抑制劑家族，以大豆胰蛋白酶抑制劑(soybean trypsin inhibitor)為代表，此型的抑制劑較少，分子量約 18 至 24 kDa，半胱胺酸的含量較低，約 100 個胺基酸中，含 2 個半胱胺酸，通常具有一條或兩條的多肽鏈並可形成兩對雙硫鍵。

蛋白酶在癌細胞產生的發展上，除了與細胞侵襲及轉移有關外 (Ennediy and Wan, 2002)，蛋白酶還可使細胞失去接觸性生長抑制 (contact inhibition) 的性質，而使癌細胞毫無限制的生長，甚至發生重疊 (pile up) 現象，並且由於蛋白酶在細胞表面作用，使得細胞膜的性質也發生變化，不但形狀異常，細胞膜上接受器的移動能力會增加，使得親醣蛋白質對其之凝集活性增加，而這些性質在給予蛋白酶抑制劑後均會改善，故如何利用蛋白酶抑制劑來抑制腫瘤細胞的生長，乃為一項極具研究意義的工作 (Meyskens, 2001; Kennedy et al, 2002; Malkowicz et al, 2003)。

本論文主要是研究台灣欒樹種子所萃取出胰蛋白酶抑制劑 (*Koelreuteria formosana* trypsin inhibitor: KFTI)對於 HT-29 大腸直腸癌細胞的生長影響。我們從本土的台灣欒樹種子萃取、純化出一種屬於 Kunitz type 蛋白酶抑制劑，分子量約 19 kDa，由 12.3 kDa 及 6.7 kDa 兩條多肽鏈以雙硫鍵連接所組成，稱為台灣欒樹胰蛋白酶抑制劑(KFTI) (Hung et al., 2015)。

首先，以不同濃度的 KFTI 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 annexin-V 染色再利用流式細胞儀觀察 HT-29 細胞 M2(凋亡細胞)是否有明顯上升，最後再以西方墨點試驗檢測細胞凋亡相關蛋白如 caspase-3、PARP、Bax，觀察 KFTI 會使得 HT-29 生長抑制是否因誘導細胞走向 apoptosis 路徑。

## 2. 研究方法

### 2.1 KFTI 之萃取純化

秤取台灣欒樹種子 200 克(採自元培醫事科技大學附近丘陵地生長之台灣欒樹)，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，利用硫酸銨鹽析取 70%至 90%濃度沉澱的蛋白質，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 Sephadex G-50 (1.5 × 90 公分)管柱，將具有抑制胰蛋白酶活性的部份，通入以 0.01 M, pH 8.0 的磷酸鹽緩衝液平衡過的 DEAE-cellulose 管柱(4.5 × 10 公分)，以含 0 至 0.3 N 氯化鈉的磷酸鹽緩衝液(0.01 M, pH 8.0)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，最後以 0.01N HCl 溶液沖提，可得到一個具有抑制胰蛋白酶活性的蛋白吸收峰，此即所欲純化的 KFTI，藉由 15% SDS-PAGE 決定其純度及分子量 (Hung et al., 2015)。

## 2.2 KFTI 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 KFTI 與 0.5 毫升胰蛋白酶溶液 (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 KFTI 溶液，其餘步驟與實驗組相同。空白組是以 0.5 毫升 KFTI 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)。所有的實驗都重複做三次。

## 2.3 SDS-聚丙烯醯胺凝膠電泳法(SDS-polyacrylamide gel electrophoresis)：

利用 15 % 的 SDS-PAGE 來分析蛋白質。而蛋白質則用 0.1 % Coomassie Brilliant Blue R-250 染色來偵測。

## 2.4 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 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% CO<sub>2</sub> 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。

## 2.5 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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 KFTI 處理的細胞之吸光值為對照組，並以含 KFTI (5、10 和 20  $\mu$ M)處理的細胞之吸光值除以未加 KFTI 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。



## 2.6 以 annexin-V 檢測細胞凋亡

實驗使用市售的試劑套組(annexin-V apoptosis kit, Gene-Biotech Co., LTD, Cat. No. FC007)之建議方法進行檢測,細胞發生凋亡時,先前分佈在細胞膜內側的磷脂醯絲胺酸(phosphatidylserine)會外翻到外側,annexin V 為一個鈣離子依賴的磷脂結合蛋白,對磷脂醯絲胺酸具有很強的結合力,利用 annexin V 此一特性偵測細胞是否產生凋亡。首先將  $1 \times 10^6$  的細胞種於 10 公分培養皿,培養於  $37^\circ\text{C}$  培養箱過夜,吸除舊培養液後加入新培養液並且使用不同濃度 KFTI 處理,培養於  $37^\circ\text{C}$   $\text{CO}_2$  培養箱 72 小時。收集細胞時,收集上清液並使用 trypsin-EDTA 使細胞自培養盤底部脫離收集至 15ml 離心管,使用  $350 \times \text{g}$  離心 5 分鐘,去除上清液後加入 5ml 冰冷 PBS 懸浮細胞後離心沖洗兩次,加入 1ml 1X 溶液 A (annexin-A binding buffer; 0.01M HEPES/NaOH, pH7.4, 0.14M NaCl, 2.5mM  $\text{CaCl}_2$ ) 將細胞懸浮成  $1 \times 10^6$  細胞/毫升,  $350 \times \text{g}$  離心 5 分鐘後移除上清液,加入  $100 \mu\text{l}$  1X solution A 並將細胞懸浮,再加入  $2 \mu\text{l}$  溶液 B (1mg/ml annexin V conjugated with FITC) 和  $5 \mu\text{l}$  溶液 C (propidium iodide staining solution), 均勻混合後於室溫下避光反應 15 分鐘,反應結束後再加入  $400 \mu\text{l}$  1X 溶液 A 後即可使用流式細胞儀上機分析。

## 2.7 免疫染漬法

### 2.7.1 細胞蛋白萃取

將  $1 \times 10^6$  HT-29 的細胞接種於 10 公分培養皿,經過 KFTI ( $10 \mu\text{M}$ )處理 24、48、72 小時過後,將培養皿置於冰上,吸除舊培養液,加入 5ml 冰冷 PBS 沖洗培養皿兩次,完全吸除 PBS 後加入  $150 \mu\text{l}$  lysis buffer (10mM Tris-HCl pH 7.4, 50mM NaCl, 1% Triton X-100 及 1% proteinase inhibitor cocktail), 使用細胞刮勺將細胞刮取下放置 1.5 ml 微量離心管中,放置於冰上反應 30 分鐘,將細胞溶解及蛋白質充分溶出,在 13000 rpm 離心 30 分鐘  $4^\circ\text{C}$ , 取上清液至新的 1.5ml 微量離心管,測定蛋白濃度。

### 2.7.2 蛋白質濃度測定

蛋白質定含量是根據 Bradford 的方法 (Bradford, 1976), 利用 Coomassie Brilliant Blue G-250 染色來決定,在 595 nm 吸收波長下測定。牛血清白蛋白 (1 毫克/毫升) 作為蛋白質標準物。

### 2.7.3 蛋白質轉漬

以跑完 SDS-PAGE 的膠體進行蛋白質轉漬,本實驗是使用 Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad)進行轉印,電泳結束後取下分離膠 (separating gel) 浸泡於 transfer buffer (25mM Tris, 192mM glycine, pH 8.3, 20% methanol)中 20 分鐘,再將 PVDF 膜 (MILLIPORE Co. U.S.A.)浸潤於 100%甲醇溶液中,5 分鐘後連同 6 張 3mm 濾紙一起浸泡於 transfer buffer,轉印時由下而上擺放順序為 3 張濾紙、PVDF 膜、分離膠、3 張濾紙,以 20 伏特,30 分鐘進行轉印。完成後 PVDF 膜以 ponceau S 進行初步染色確定是否轉印成功,然後以 TTBS (10mM Tris-HCl, pH 7.5, 16mM NaCl, 0.2% Tween 20) 沖洗進行退染。再將 PVDF 膜放入 blocking buffer (TBST 含 5% 安佳脫脂奶粉)中,於  $37^\circ\text{C}$  反應 1 個小時進行遮蔽反應。

### 2.7.4 免疫墨點法(Immunoblotting)

自 blocking buffer 中取出 PVDF 膜,加入適當稀釋的專一性的一級抗體(specific primary antibody) (含 3%安佳脫脂奶粉的 TBST),專一性的一級抗體有當作 loading control 的  $\beta$ -actin (mouse anti- $\beta$ -actin, monoclonal, Biovision)及細胞凋亡相關的抗體, caspase-3 (mouse anti-caspase-3, monoclonal, ZYMED)、PARP (goat anti PARP, polyclonal, R&D)、Bax (goat anti- Bax, polyclonal,



R&D) 於 4°C 下進行雜交反應隔夜，反應結束後，以 TBST 清洗三次，每次 10 分鐘，加入適當稀釋的二級抗體(secondary antibody) (anti-mouse IgG conjugated HRP、anti-goat IgG conjugated HRP、anti-rabbit IgG conjugated HRP)置於室溫下避光反應 1 小時後，以 TBST 清洗 10 分鐘，此動作重複 3 次，最後以 ECL 呈色技術壓片，使 X 光片感光 ECL 冷光訊號。

## 2.8 統計分析

本論文數據至少三重覆之結果，實驗結果以平均值±標準偏差值(mean±SD)表示，各實驗數據皆使用統計軟體(SPSS v17.0)進行分析，二組相關數據間的比較以 unpaired student' s t-test 分析。三組及三組以上相關數據間的差異以 ANOVA 進行單因子變異數分析，並且利用 Tukey' s HSD 檢驗法做顯著性差異之比較。若  $p < 0.05$ ，則表示統計上有顯著差異。

## 3. 結果

### 3.1 台灣藥樹胰蛋白酶抑制劑(KFTI)之純化

KFTI 的純化方法是先將台灣藥樹的種子洗淨，以 0.01N 醋酸緩衝溶液浸泡，之後利用組織均質機將種子打成泥狀，以利萃取蛋白質。所得之粗萃取液，將 70%至 90%硫酸銨濃度沉澱的蛋白質對 0.01N 醋酸作透析。完全透析後，將上清液離心過濾，通過 Sephadex G-50 管柱，陰離子交換樹脂 DEAE-cellulose 管柱，Trypsin-Sepharose 4B 親和性管柱，可得到一個具有抑制胰蛋白酶活性的蛋白。接著利用 15% SDS-PAGE 分析，可得知 KFTI 分子量約為 19 kDa，當加入還原劑  $\beta$ -mercaptoethanol 時，可發現 KFTI 是由二條 polypeptides 所組成，分子量分別為 12.3 kD 和 6.7kDa (圖 1)。

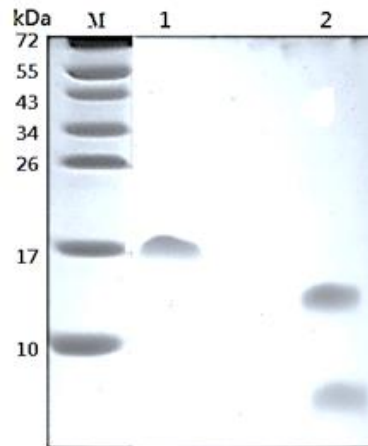


圖 1 KFTI 之純化。用 15% SDS-PAGE 電泳分析。Lane M: 標準蛋白質分子量，Lane 1：trypsin-Sepharose 4B 親和性管柱所純化的 KFTI 加，Lane 2: KFTI 以還原劑  $\beta$ -mercaptoethanol 處理。

### 3.2 MTT assay (偵測細胞存活率)

此實驗分別以 5  $\mu$ M、10  $\mu$ M、20  $\mu$ M 的 KFTI 處理大腸直腸癌細胞 (HT-29) 24、48、72 小時來觀察其細胞存活率，發現 HT-29 在 KFTI 10  $\mu$ M 48 小時就有明顯下降( $p < 0.05$ )，72 小時 HT-29



有較明顯下降，以  $10\ \mu\text{M}$  或者  $20\ \mu\text{M}$  處理 HT-29 細胞 72hr 效果較為明顯，但因  $10\ \mu\text{M}$ 、 $20\ \mu\text{M}$  兩個濃度效果差不多(圖 2)，於是就決定用  $10\ \mu\text{M}$  KFTI 處理 72 小時去做之後有關細胞凋亡的相關實驗。

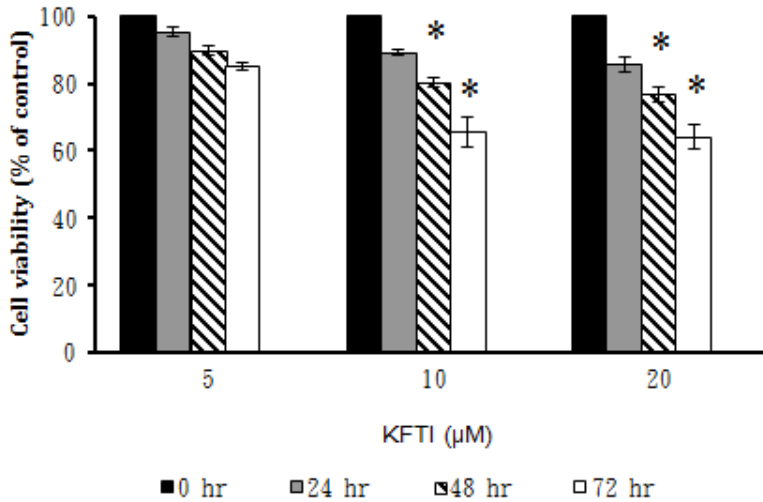


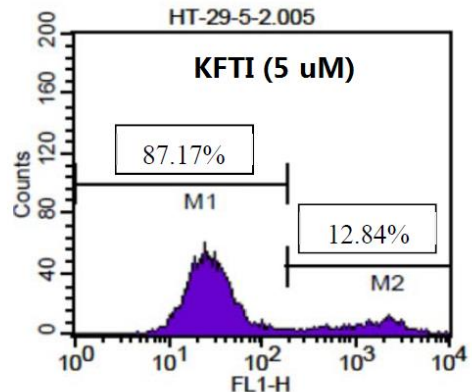
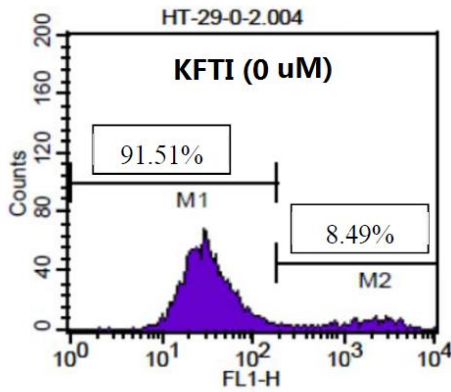
圖 2 不同濃度 KFTI 處理大腸直腸癌細胞後偵測細胞存活率。以不同濃度 KFTI 處理大腸直腸癌細胞(HT-29) 0、24、48、72 小時，以 MTT assay 偵測細胞存活率。每個濃度進行三重複，數據各以統計軟體 SPSSv17.0 分析，數據以百分比表示，\*表示有顯著差異 ( $p$  value <0.05)。

### 3.3 以 annexin V 檢測細胞凋亡

另一個可能影響大腸直腸癌細胞生長的原因是 KFTI 誘導大腸直腸癌細胞產生細胞凋亡。因此本文使用 Annexin V-FITC apoptosis 分析細胞是否有產生凋亡。在細胞早期凋亡時，磷脂醯絲胺酸會由細胞膜內側翻到外側，而 annexin V 對磷脂醯絲胺酸有專一性親和力，annexin V 接上 FITC 螢光物質後，便可使用流式細胞儀偵測細胞是否產生凋亡。圖 3 為不同濃度 KFTI 處理大腸直腸癌細胞 72 小時後，細胞產生細胞凋亡的結果，發現隨 KFTI 的濃度上升，annexin V 陽性的細胞有明顯增加。 $10\ \mu\text{M}$  KFTI 處理 72 小時後，M2 (凋亡細胞)增加到 16.68%。由此結果可知，KFTI 能夠誘導大腸直腸癌細胞 HT-29 產生細胞凋亡。



A



B

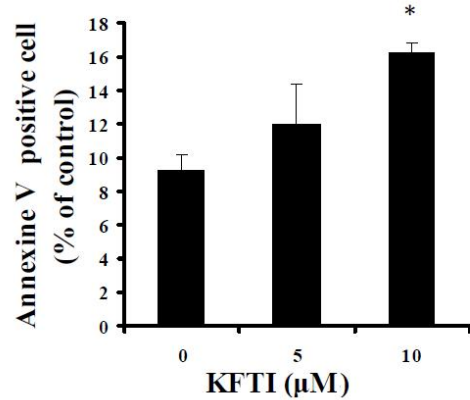
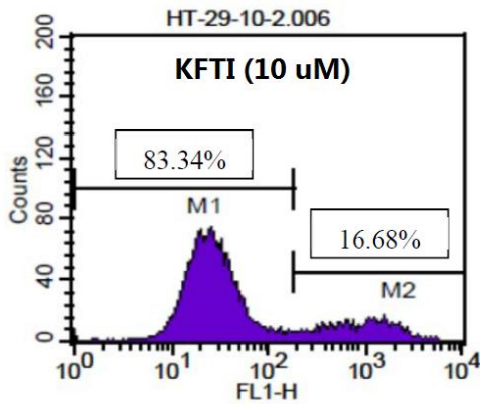


圖 3 不同濃度 KFTI 誘導大腸直腸癌細胞膜磷脂醯絲胺酸外翻之細胞凋亡敏感性。A：以不同濃度 KFTI 處理大腸直腸癌細胞 72 小時，利用胰蛋白酶懸浮並收集細胞，用 binding buffer 清洗細胞後，以 annexin V 染色，最後利用流式細胞儀分析統計 annexin V 陽性細胞數量。B：以三重複之 M2(凋亡細胞)數據以統計軟體 SPSSv17.0 分析，數據以百分比表示，\*表示有顯著差異 (P value <0.05)。

### 3.4 KFTI 對大腸直腸癌細胞之細胞凋亡相關蛋白質表現量變化之影響

Bcl-2 為人體內最主要的抗凋亡基因，主要存在於粒粒線體外膜，其主要作用為抑制促凋亡基因 Bax 的作用，防止粒線體通透性改變及膜電位增加，並抑制 cytochrome c 由粒線體釋放至細胞液中，阻止細胞凋亡。而 Bax 也屬於 Bcl-2 家族的一員，但作用為促進細胞凋亡，Bax 能夠與 Bcl-2 結合成二聚體，造成粒線體膜通透性增加及膜電位改變，讓 cytochrome c 由粒線體釋放至細胞液中，以達成細胞凋亡的目的。當細胞接受外界刺激時，若細胞走向凋亡，Bax 和 Bcl-2 便結合成二聚體，讓離子通道活化開啟，若接下來的凋亡訊號沒有被抑制，細胞凋亡的關鍵蛋白 caspase 3 會被活化成 cleavage caspase 3 進而切割細胞序列(PARP, poly (ADP-ribose) polymerase)，使 PARP 片斷化。而先前的研究也指出 Bax、Bcl-2 在細胞內的比列上升也會引起細胞凋亡(Oltvai et al, 1993, Pal et al, 2016)；本實驗結果得知發現隨著 10 μM KFTI 的處理時間增加，Bax、cleavage caspase 3 及 cleavage PARP 濃度皆明顯的增加 (圖 4A)，10 μM KFTI 處理 72 小時後，Bax 濃度比沒有處理 KFTI 時上升 31.1%、cleavage caspase 3 濃度上升 93.1 %、cleavage PARP 濃度上升 32.3 % (圖 4B)，



表示 KFTI 可誘導大腸直腸癌細胞 HT-29 走向細胞凋亡。

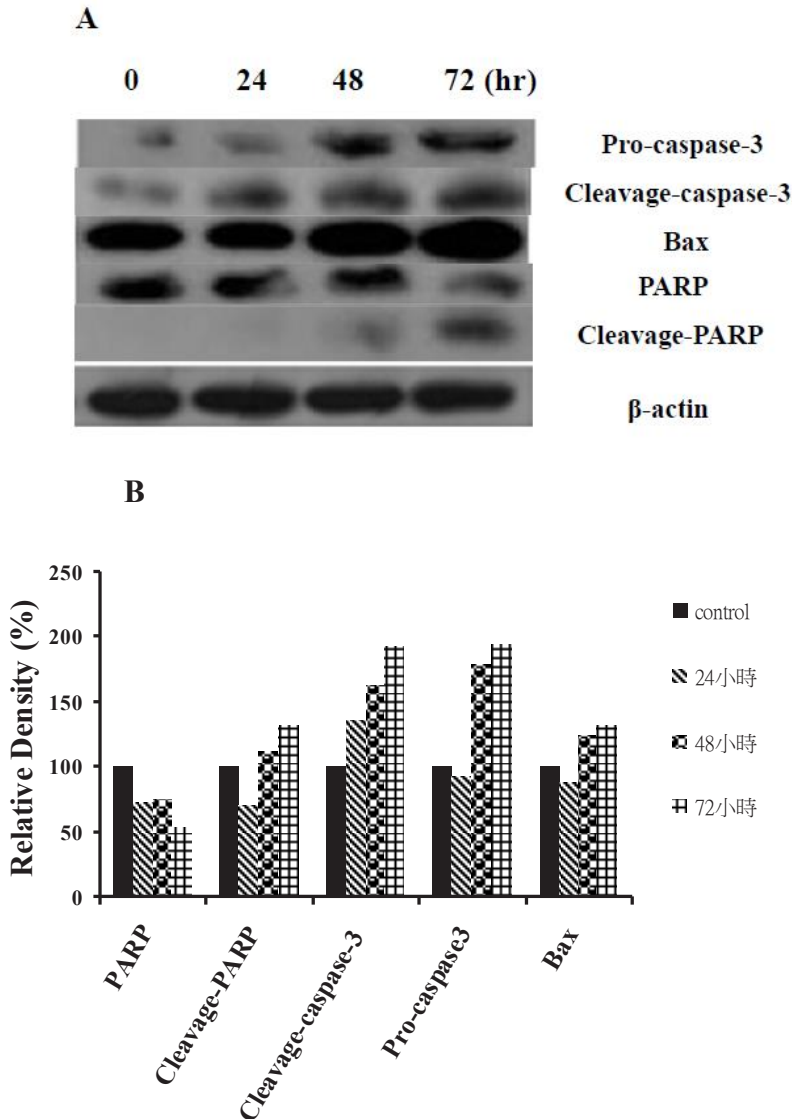


圖 4 KFTI 對大腸直腸癌之細胞凋亡相關性蛋白質 PARP、caspase-3、Bax 表現量的影響。A：細胞以濃度 10  $\mu$  M KFTI 處理 24、48、72 小時後，收集蛋白質並定量，以 SDS-PAGE 分離蛋白，將分離膠上的蛋白轉漬於 PVDF 膜上，進行西方墨點法，分析細胞凋亡相關性蛋白質 PARP、caspase-3、Bax 的濃度變化。 $\beta$ -actin 為 loading control。B：使用電腦掃描及 SigmaPlot 統計軟體將其數據化的結果

#### 4. 討論

在最近的研究發現，胰蛋白酶抑制劑在抵抗害蟲、抑制發炎反應、凝血功能及誘導癌細胞凋亡的產生，都扮演著重要的角色(Rufino et al., 2013; Oliva et al., 2010; Fang et al., 2010; Xu et al., 2011; Lee et al., 2012)。





本研究從台灣欒樹種子純化出一種新的胰蛋白酶抑制(KFTI)，以 15% SDS-PAGE 分析，得知其分子量約 19 kDa，由 12.3 kDa 及 6.7 kDa 兩條多肽鏈以雙硫鍵連接所組成，結構類似分子量約 18-24 kDa，由一條或兩條多肽鏈所組成的 Kunitz-type 胰蛋白酶抑制劑(Macedo et al, 2007; Oliveira et al, 2001; Cruz et al, 2013)。

細胞凋亡的過程主要有兩大訊息傳遞路徑 (apoptotic signals transduction pathway)：(1)外源性凋亡路徑 (extrinsic apoptosis pathway)，亦即死亡受體介導途徑 (death receptor-mediated pathway)。主要是死亡受體 (death receptor) 的啟動或誘導訊息所形成的複合物觸發凋亡蛋白酶(caspase)的活化，啟動細胞凋亡 (Schleich and Lavrik, 2013)。(2)內源性凋亡路徑 (intrinsic apoptosis pathway)，又可稱為粒線體途徑 (mitochondrial pathways)。此途徑可由多種信號誘發導致 cytochrome c 從粒線體中釋放到細胞質，誘導凋亡蛋白酶 (caspase) 的一系列反應(Yu et al, 2013)。

從 KFTI 對 HT-29 細胞凋亡相關蛋白質表現量變化的結果，得知隨著 KFTI 處理時間增長，細胞內的 Bax 蛋白質濃度上升，cleavage caspase 3 及 cleavage PARP 蛋白質濃度均為上升，表示 KFTI 可經由內在路徑誘導大腸直腸癌細胞走向細胞凋亡，因粒線體調節細胞凋亡內在路徑是經由控制 Bcl-2 家族因子。Bcl-2 家族(Bim, Bax, Bak, Bid)包含了抗凋亡及促凋亡因子(Nakazawa et al, 2003)。使用 annexin V-FITC apoptosis 分析細胞凋亡的實驗得到 annexin V 陽性的細胞有明顯增加，進一步證實了這個結果；所以 KFTI 抑制大腸直腸癌細胞(HT-29)生長的部分原因可能為它能經由增加 Bax 表現量，降低 Bcl-2 表現，進而促進 caspase-3 的活化，因此能誘導細胞凋亡。

在先前的研究中，從相思樹種子純化出的相思樹胰蛋白酶抑制劑可抑制 MAPK pathway 中的磷酸化 ERK1/2 表現量，導致 MMP-2 及 MMP-9 的表現量下降，進而抑制細胞的侵入(Hung, et al, 2014)。另外有研究指出 Bowman-Birk type 蛋白酶抑制劑可抑制 MAPK pathway 中的磷酸化 ERK1/2 表現量，引發 MAP 激素的產生，進而抑制癌細胞的侵入(Chen et al, 2005)。所以在未來的研究中，我們可以去探討 KFTI 是否也會誘發 MAPK pathway 的產生或者誘導其它癌細胞產生凋亡。

## 參考文獻

- [1] Bradford, M. M., "A Rapid and Sensitive Method for the Quantification of Microgram Quantities of Protein Using the Principle of Protein-dye Binding," *Analytical Biochemistry*, Vol. 72, 1976, pp. 248-254.
- [2] 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.
- [3] Cruz, A. C. B., Massena, F. S., Migliolo, L., Macedo, L. L. P., Monteiro, N. K. B., Oliveira, A. S., Macedo, F. P., Uchoa, A. F., Grossi de Sá, M. F., Vasconcelos, I. M., Murad, A. M., Franco, O. L. and Santos, E. A., "Bioinsecticidal Activity of a Novel Kunitz Trypsin Inhibitor from Catanduva (*Piptadenia moniliformis*) Seeds," *Plant Physiology and Biochemistry*, Vol. 70, 2013, pp. 61-68.
- [4] Dunaevsky, Y. E., Elpidina, E. N., Vinokurov, K. S. and Belozersky, M. A., "Protease Inhibitors in Improvement of Plant Resistance to Pathogens and Insects," *Molecular Biology*, Vol. 39, 2005, pp. 608-613.
- [5] Ennedy, A. R. and Wan, X. S., "Effects of the Bowman-Birk Inhibitor on Growth, Invasion, and Clonogenic Survival of Human Prostate Epithelial Cells and Prostate Cancer Cells," *Prostate*, Vol. 50, 2002, pp. 125-33.



- [6] Fang, E.F., Wong, J.H. and Ng, T.B., “Thermostable Kunitz Trypsin Inhibitor with Cytokine Inducing, Antitumor and HIV-1 Reverse Transcriptase Inhibitory Activities from Korean Large Black Soybeans,” *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Vol. 109, 2010, pp. 211-217.
- [7] Felton, G. W., Duffey, S. S., “Protective Action of Midgut Catalase in *Lepidopteran* Larvae Against Oxidative Plant Defenses,” *Journal of Chemical Ecology*, Vol. 17, 1991, pp. 1715-32.
- [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] Haq, S. K., Atif, S. M. and Khan, R. H., “Protein Proteinase Inhibitor Genes in Combat Against Insects, Pests, and Pathogens: Natural and Engineered Phytoprotection,” *Archives of Biochemistry and Biophysics*, Vol. 431, 2004, pp. 145-159.
- [10] Harborne, J. B., “Role of Secondary Metabolites in Chemical Defence Mechanisms in Plants.” *Ciba Foundation Symposium*, Vol. 154, 1990, pp. 126-34.
- [11] Heitz, T., Geoffroy, P., Fritig, B. and Legrand, M., “The PR-6 Family: Proteinase Inhibitors in Plant Microbe and Plant Insect Interactions,” In: Datta, S.K., Muthukrishnan, S. (Eds.), *Pathogenesis — Related Proteins in Plants*. CRC Press, Boca Raton, 1999, pp. 131-155.
- [12] Hung, C. H., Wu, C. C. and Wang, H. L., “Inhibition of Invasion in Human Colon Adenocarcinoma Cells by *Acacia confusa* Trypsin Inhibitor,” *Journal of Health Management*, Vol. 12, 2014, pp. 49-60.
- [13] Hung, C. H., Dong, C. F. and Wang, H. L., “Purification and Characterization of a Trypsin Inhibitor from *Koelreuteria formosana* Seeds,” *Journal of Health Management*, Vol. 13, 2015, pp. 1-12.
- [14] Kennedy, A. R., Billings, P. C., Wan, X. S. and Newberne, P. M., “Effects of Bowman-Birk Inhibitor on Rat Colon Carcinogenesis,” *Nutrition and Cancer*, Vol. 42, 2002, pp. 174-186.
- [15] Lee, S. H., Kim, H. J., Han, H. J., Li, M., Kwak, S. H. and Park, S., “Urinary Trypsin Inhibitor Attenuates Lipopolysaccharide-induced Neutrophil Activation,” *Korean Journal of Anesthesiology*, Vol. 63, 2012, pp. 540-546.
- [16] Lima, T. B., Silva, O. N., Migliolo, L., Souza-Filho, C. R., Goncalves, E.G., Vasconcelos, I. M., Oliveira, J. T. A., Amaral, A. C. and Franco, O. L., “A Kunitz Proteinase Inhibitor from Corms of *Xanthosoma Blandum* with Bactericidal Activity,” *Journal Of Natural Products*, Vol. 74, 2011, pp. 969-975.
- [17] Lopes, J. L. S., Valadares, N. F., Moraes, D. I., Rosa, J. C., Araujo, H. S. S. and Beltramini, L. M., “Physico-Chemical and Antifungal Properties of Protease Inhibitors from *Acacia plumosa*,” *Phytochemistry*, Vol. 70, 2009, pp. 871-879.
- [18] Macedo, M. L. R., Garcia, V. A., Freire, M. G. M. and Richardson, M., “Characterization of a Kunitz Trypsin Inhibitor with a Single Disulfide Bridge from Seeds of *Inga laurina* (SW.) Wild,” *Phytochemistry*, Vol. 68, 2007, pp. 1104-1111.
- [19] Malkowicz, S. B., Liu, S. P., Broderick, G. A., Wein, A. J., Kennedy, A. R. and Levin, R. M., “Effect of the Bowman-Birk Inhibitor (a Soy Protein) on in Vitro Bladder Neck/Urethral and Penile Corporal Smooth Muscle Activity,” *Neurourology and Urodynamics*, Vol. 22, 2003, pp. 54-57.



- [20] Meyskens, F. L., “Development of Bowman-Birk Inhibitor for Chemoprevention of Oral Head and Neck Cancer,” *The Annals of the New York Academy of Sciences*, Vol. 952, 2001, pp. 116-23.
- [21] Nakazawa, Y., Kamijo, T., Koike, K. and Noda, T., “ARF Tumor Suppressor Induces Mitochondria-dependent Apoptosis by Modulation of Mitochondrial Bcl-2 Family Proteins,” *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 278, 2003, pp. 27888-27895.
- [22] Oliva, M. L., Silva, M. C., Sallai, R. C., Brito, M. V. and Sampaio, M. U., “A novel Subclassification for Kunitz Proteinase Inhibitors from Leguminous Seeds,” *Biochimie*, Vol. 92, 2010, pp. 1667-1673.
- [23] Oliveira, C., Santana, L. A., Carmona, A. K., Cezari, M. H., Sampaio, M. U., Sampaio, C. A. and Oliva, M. L., “Structure of Cruzipain/Cruzain Inhibitors Isolated from *Bauhinia bauhinioides* Seeds,” *Biological Chemistry*, Vol. 382, 2001, pp. 847-852.
- [24] Oltvai, Z. N., Milliman, C. L. and Korsmeyer, S. J., “Bcl-2 Heterodimerizes in Vivo with a Conserved Homolog, Bax, That Accelerates Programmed Cell Death,” *Cell*, Vol. 74, 1993, pp. 609-619.
- [25] Pal, M. K., Jaiswar, S. P., Srivastav, A. K., Goyal, S., Dwivedi, A., Verma, A., Singh, J., Pathak, A. K., Sankhwar, P. L. and Ray, R.S., “Synergistic Effect of Piperine and Paclitaxel on Cell Fate via Cyt-c, Bax/Bcl-2-Caspase-3 Pathway in Ovarian Adenocarcinomas SKOV-3 Cells,” *European Journal of Pharmacology*, Vol. 791, pp. 751-762.
- [26] Richardson, M., Seed Storage Proteins: the Enzyme Inhibitors, in: Rogers, J. L. Ed. *Methods in Plant Biochemistry, Amino Acids, Proteins and Nucleic Acids*; Academic Press: New York, 1991, pp. 259-305.
- [27] Rufino, F. P., Pedroso, V. M., Araujo, J. N., França, A. F., Rabêlo, L. M., Migliolo, L., Kiyota, S., Santos, E. A., Franco, O. L. and Oliveira, A. S., “Inhibitory Effects of a Kunitz-type Inhibitor from *Pithecellobium dumosum* (Benth) Seeds Against Insect-pests’ Digestive Proteinases,” *Plant Physiology and Biochemistry*, Vol. 63, 2013, pp. 70-76.
- [28] Ryan, C. A., “Protease Inhibitors in Plants: Genes for Improving Defenses Against Insect and Pathogens,” *Annual Review of Phytopathology*, Vol. 28, 1990, pp. 425-449.
- [29] Schleich, K. and Lavrik, I. N., “Mathematical Modeling of Apoptosis,” *Cell Communication and Signaling*, Vol. 11, 2013, 44. doi: 10.1186/1478-811X-11-44.
- [30] Wu, H. C. and Lin, J. Y., “The Complete Amino Acid Sequence of a Kunitz-type Trypsin Inhibitor from Seeds of *Acacia confuse*,” *Journal of Biochemistry*, Vol. 113, 1993, pp. 258-263.
- [31] Xu, Y., Qin, X., Zhou, J., Tu, Z., Bi, X., Li, W., Fan, X. and Zhang, Y., “Tissue Factor Pathway Inhibitor-2 Inhibits the Growth and Invasion of Hepatocellular Carcinoma Cells and Is Inactivated in Human Hepatocellular Carcinoma,” *Oncology Letters*, Vol. 2, 2011, pp. 779-783.
- [32] Yu, J. H., Zheng, G. B., Liu, C. Y., Zhang, L.Y., Gao, H. M., Zhang, Y. H., Dai, C. Y., Huang, L., Meng, X. Y., Zhang, W. Y. and Yu, X. F., “Dracorhodin Perchlorate Induced Human Breast Cancer MCF-7 Apoptosis through Mitochondrial Pathways,” *International Journal of Molecular Medicine*, Vol. 10, 2013, pp. 1149-56.

