

# 相思樹胰蛋白酶抑制劑誘導人類結腸腺癌細胞 (SW480) 凋亡之研究

## Induction of Apoptosis by *Acacia confusa* Trypsin Inhibitor in Human Colon Adenocarcinoma Cancer Cells (SW480)

高淳瑜<sup>1</sup> Chun-Yu Kao      王海龍<sup>1</sup> Hai-Lung Wang

洪志宏<sup>1\*</sup> Chih-Hung Hung

<sup>1</sup> 元培醫事科技大學醫學檢驗生物技術系

<sup>1</sup> Department of Medical Laboratory Science and Biotechnology, Yuanpei University  
of Medical Technology

**摘要：**本研究主要探討相思樹 (*Acacia confusa*) 種子所分離出的胰蛋白酶抑制劑 (*Acacia confusa* trypsin inhibitor; 簡稱ACTI) 誘導人類結腸腺癌細胞 (SW480) 凋亡。首先從相思樹種子中純化出ACTI, 分子量約20kDa, 是屬於Kunitz-型抑制劑。以不同的ACTI濃度處理SW480細胞, 利用trypan blue dye exclusion assay偵測細胞存活率, 發現隨著ACTI濃度及處理的時間增加, 細胞的存活率逐漸減少, 在10  $\mu$ M ACTI處理48小時後, 細胞存活率下降至83.6%, 處理72小時後細胞存活率下降至70%; 利用annexin V來檢測細胞凋亡 (apoptosis), 隨著ACTI處理SW480細胞的濃度及時間增加, 細胞進行凋亡有明顯增加的趨勢; 利用西方轉漬法 (western blotting) 分析, 發現ACTI處理SW480細胞後會導致Bcl-2蛋白質表現量降低, Bax、cleavage-caspase-9、cleavage-caspase-3及cleavage PARP增加, cytochrome c由粒線體釋出至細胞液的量增加。因此, ACTI抑制SW480 細胞生長, 是藉由誘導SW480 cells 走向細胞凋亡路徑。

**關鍵字：** Kunitz-型、相思樹胰蛋白酶抑制劑、結腸腺癌細胞、細胞凋亡

\* 通訊作者：洪志宏博士, 地址：30015 新竹市元培街306號  
E-mail: chihhung@mail.ypu.edu.tw, 聯絡電話：03-5381183 # 8169, 傳真電話：03-6102327



**ABSTRACT:** The main specific aim of this study is to study the properties of *Acacia confusa* trypsin inhibitor (ACTI) isolated from the seeds of *Acacia confusa*. First, ACTI was purified from seeds of *Acacia confusa*. The molecular weight of ACTI is about 20 kDa. It belongs to Kunitz-type inhibitor. The human SW480 colon adenocarcinoma cells were treated with different concentrations of ACTI and the cell survival rates were analyzed by trypan blue dye exclusion assay. The cell survival rate decreased as the ACTI concentrations increased at 48 hours. The cell survival rate decreased to 83.6% at 10  $\mu$ M and to 70% after 72-hour incubation. The apoptosis of SW480 cells was detected with Annexin V. In treatments of SW480 cells with different ACTI concentrations, apoptotic effects were detected. As the time of ACTI treatments increased, the Annexin-positive cells increased significantly. ACTI was able to induce SW480 cells to apoptosis. On the other hand, by western blotting, it was found that ACTI induced Bax activation, Bcl-2 down regulation, cleavage- caspase-9 activation, cleavage- caspase-3 activation, cleavage PARP activation and the increased cytochrome c releasing from mitochondria, as well as indicated that ACTI drove cell to apoptosis. Therefore, ACTI inhibits the human colorectal cancer cell growth by inducing cells to apoptotic pathways.

**Keywords:** Kunitz-type、*Acacia confusa* trypsin inhibitor、colon adenocarcinoma cells、apoptosis

## 1. 前言

植物內所含胰蛋白酶抑制劑，依分子量大小及半胱胺酸含量，大致可分成兩類 (Worowski and Roszkowska, 1979)，一為Kunitz型，分子量約18-24 kDa，通常含有四個半胱胺酸，且會形成兩對雙硫鍵；含有較少的半胱胺酸，每100個胺基酸含有2個半胱胺酸，具有一條或兩條多肽鏈 (polypeptide chain) 並可形成兩對雙硫鍵 (Gotor et al., 1995)。另外一類為Bowman-Birk型，分子量較小，約8-10kDa，含有很高的半胱胺酸，每100個胺基酸含有20個半胱胺酸，通常可形成7-8對的雙硫鍵 (Odani & Ikenaka, 1978)。

胰蛋白酶抑制劑具有殺蟲的活性 (Dias et al., 2017; Pandey et al., 2016)。病原微生物的蛋白酶常是致病毒性因子，適當作為設計新藥的目標。所有植物種子中都含有幾種特殊生物活性功能的蛋白質，包括作為防禦機制對抗病原體的分，這些分子中以水解酶，酶抑制劑，凝集素 (lectins) 以及傷害細胞因子 (cell-killing factors)，如核糖體去活性蛋白質 (ribosome inactivating proteins) 是最具代表性的。從生物醫學領域來看，胰蛋白酶抑制劑具有良好的藥物動力學特性，因此被選擇用於開發新藥是具有吸引力的 (Eatemadi et al., 2017)，早在1960年代，一種Kunitz型絲胺酸蛋白酶抑制劑-抑肽酶 (aprotinin) 就被廣泛用於治療急性胰腺炎 (acute pancreatitis) (Brandl et al., 2016)。血管生成 (angiogenesis)，



在胚胎發育、傷口癒合、胎盤形成、腫瘤形成的過程中扮演重要的角色，最近從厚皮甜瓜 (*Cucumis melo*) 種子中純化的胰蛋白酶抑制劑具有抗血管生成的潛力 (Rasouli et al, 2017)。

植物來源的食物能夠預防三分之一的癌症。富含植物的飲食可以抑制慢性病的進展，例如依賴血管生成的惡性實體瘤 (malignant solid tumors)。此外，抗瘧疾活性 (antimalarial activity) 和抗菌活性如抗白色念珠菌 (*Candida albicans*)、銅綠假單胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 及枯草芽孢桿菌 (*Bacillus subtilis*) 均已被描述 (Tripathi et al., 2014; Dabhade et al., 2016)。

蛋白酶參與重要的生理調控機轉，如細胞週期、細胞死亡、DNA複製、止血、免疫反應、組織重建和傷口癒合 (Nakahata et al., 2006)。蛋白酶在癌細胞的發展上，除了與細胞侵襲及轉移 (Kennedy and Wan, 2002) 有關外，蛋白酶還可以使細胞生長失去接觸性抑制作用 (contact inhibition) (Burger, 1970)，使得癌細胞毫無限制的生長，甚至有重疊 (pile up) 現象，故研究蛋白酶抑制劑來抑制腫瘤細胞的生長，乃為一項極具有意義的工作。

相思樹 (*Acacia confusa*)，又名台灣相思、香絲樹、相思仔、假葉豆，屬於豆科 (Leguminosae) 含羞草亞科的成員。相思樹胰蛋白酶抑制劑 (ACTI) 是由A鏈跟B鏈以兩對雙硫鍵所組成的蛋白質，A鏈含136個胺基酸，B鏈含有39個胺基酸，分子量19.4 kDa，屬於Kunitz-型抑制劑 (Lin et al., 1991)。ACTI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)。

本研究以不同濃度的ACTI處理人類結腸腺癌細胞 (SW480)，利用trypan blue dye exclusion assay偵測細胞存活率，以annexin-V染色再利用流式細胞儀觀察SW480細胞M2 (凋亡細胞) 是否有明顯上升，最後以西方轉漬法檢測與細胞凋亡相關的蛋白，如caspase-3、PARP、Bax的蛋白質表現量，證實ACTI會使得SW480生長抑制是因誘導細胞走向細胞凋亡路徑。

## 2. 研究方法

### 2.1 ACTI 之純化

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0.01 M, 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70%的飽和度，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95%飽和度，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



#### 4 相思樹胰蛋白酶抑制剂诱导人类结肠腺癌细胞 (SW480) 凋亡之研究

先以0.01M pH 8.0的磷酸鹽緩衝液平衡過的Sephadex G-50 (1.5 x 90公分) 管柱，以0.01 M 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的吸光度及活性，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 x 10公分)，先以磷酸鹽緩衝液沖洗出無法附著於管柱上的蛋白質，再以含0至0.5 M氯化鈉磷酸鹽緩衝液階梯 (linear salt gradient) 沖提。將具有活性的試管收集，再通過 trypsin-Sepharose 4B親和性管柱 (2.2 x 20公分)，先以0.01M pH 8.0磷酸鹽緩衝液沖洗，將非特异性結合的蛋白質除去，最後以0.01 N HCl溶液沖提，可得到一個具有活性的蛋白吸收峰，此即為純化的ACTI，其純度可由12% SDS-PAGE決定 (Lin et al., 1991)。

### 2.2 蛋白質濃度的定量

蛋白質定含量是根據Bradford的方法 (Bradford et al., 1976)，利用Coomassie Blue G250染色來決定，在595 nm吸收波長下測定。牛血清白蛋白 (1mg/ml) 作為蛋白質標準物。

### 2.3 SDS- 聚丙烯醯胺凝膠電泳法 (SDS-PAGE)

利用12 % 的SDS-PAGE來分析蛋白質。以0.1 % Coomassie Brilliant Blue R-250染色來偵測。

### 2.4 細胞培養

將人類結腸腺癌細胞SW480 (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 Trypan blue dye exclusion assay

取 $1 \times 10^5$  cells 置於6公分培養皿中，隔日將培養基換成不含FBS的培養基分別加入不同濃度0.5、1、2、3、5、10  $\mu$ M的ACTI，放置於37°C，5% CO<sub>2</sub>培養箱中培養24、48、72小時。在24、48、72小時後取出，將培養基吸掉，用PBS 清洗，再利用Trypsin-EDTA溶液將細胞懸浮，並加入PBS打散細胞，取20  $\mu$ l的細胞懸浮液與20  $\mu$ l 的trypan blue (0.4%) 混合後，取20  $\mu$ l注入血球計數盤中，透過顯微鏡下進行計數 (Kennedy and Wan, 2002)。

### 2.6 細胞凋亡分析

使用市售的試劑套組 (annexin-V apoptosis kit, strong biotech corporation, Cat. No. FC007) 進行檢測，首先將 $1 \times 10^5$  cells 種於6公分培養皿，隔日將培養基換成不含FBS的培養基分別加入5、10  $\mu$ M的ACTI處理，放置於37°C，5% CO<sub>2</sub>培養72小時。收集上清液，用PBS 清洗，並利用trypsin-EDTA 溶液使細胞懸浮，並收集至15 mL 離心管，使用350 g 離心5



分鐘，去除上清液後加入PBS，並再次離心（此動作重複兩次），之後加入binding buffer，離心5分鐘（重複兩次），倒掉上清液，加入100  $\mu$ l的 binding buffer 將細胞均勻打散，加入5  $\mu$ l annexin V，避光30分鐘，反應結束後加入900  $\mu$ l 的binding buffer，即可使用流式細胞儀分析（Mi et al., 2005）。

## 2.7 西方轉漬法

### 2.7.1 蛋白質萃取

取 $2 \times 10^6$  cell 置於10公分培養皿中，隔日將培養基換成不含FBS的培養基分別加入濃度5 $\mu$ M及10  $\mu$ M的ACT1，放置於37°C，5% CO<sub>2</sub>培養箱，培養24、48、72小時。將培養基吸掉，用4°C的PBS洗2次，PBS吸乾後加入150  $\mu$ l lysis buffer（10 mM Tris-base pH7.4，50 mM NaCl，1% Trion X-100），利用細胞刮勺將細胞刮下放置離心管中，每隔10分鐘進行震盪一次，共三次，接著放置冰上30分鐘，離心12,000 rpm 30分鐘，取上清液測定蛋白質濃度。

### 2.7.2 西方轉漬法

取相同總蛋白濃度後加入sample buffer（100 mM Tris pH6.8，200 mM DTT，4% SDS，0.2% bromophenol blue，20% glycerol）以100°C處理5分鐘之後以12% SDS-PAGE進行電泳。電泳完畢，將分離膠取出進行蛋白質樣本的轉印。先將PVDF membrane 浸潤於甲醇中，之後連同濾紙一起浸泡於 transfer buffer（4.04 g CAPS，利用NaOH調pH值至11，methanol 250 ml，加蒸餾水至2公升）中，放置於轉漬槽的順序為濾紙、膠體、PVDF membrane、濾紙，之後將其放入轉漬槽中，於20 V 電流進行轉漬30分鐘，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TBST（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°C反應1個小時進行遮蔽反應。之後去除 blocking buffer，再將PVDF membrane 置於適當的專一性的一級抗體中（含3%安佳脫脂奶粉的TBST）（一級抗體： $\beta$ -actin、caspase-3、caspase-9、PARP、Bcl-2、Bax、cytochrome c），於37°C培養箱下反應2小時，再以TBST洗3次（10分鐘/次），加入 anti-mouse IgG conjugated HRP 之二級抗體於37°C培養箱下反應1小時，再以TBST洗3次（10分鐘/次），之後浸泡於TBST中，最後以ECL顯影劑顯影，並以Bio-Rad 凝膠呈像系統感光。

## 2.8 分離細胞液 cytochrome c

取 $2 \times 10^6$  cells 置於10 公分培養皿中，分別加入濃度10  $\mu$ M的ACT1，放置於37°C、5% CO<sub>2</sub>培養箱，分別培養48、72小時。利用trypsin-EDTA溶液使細胞懸浮，用1 x PBS 洗兩次，在加入lysis buffer（20 mM HEPES-KOH，pH 7.4，10 mM KCl，1.5 mM MgCl<sub>2</sub>，1 mM EDTA，1 mM DTT，protease inhibitor cocktail，250 mM sucrose），利用均質機均質30次，離心12,000 rpm，4°C 30分鐘，即可得到細胞液中的cytochrome c，再利用西方轉漬法來觀察 cytochrome c 的量（Watanapokasin et al., 2011）。



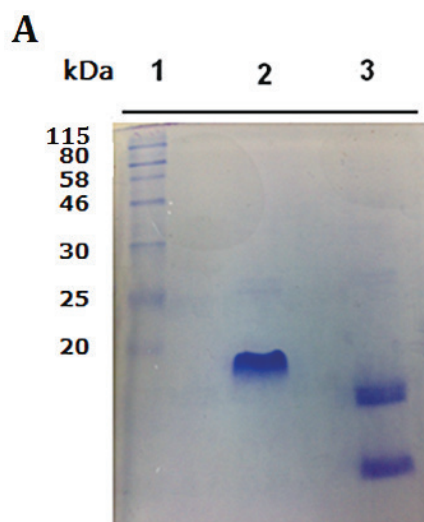
## 2.9 統計分析

實驗數據至少三重複的結果，以平均值±標準差 (mean ± SD) 表示，實驗之數據分析各實驗組及控制組之顯著差異則採用Microsoft Excel軟體中具統計分析功能之t test檢定其差異性，若兩組間之相符機率 $p < 0.05$ ，即視為顯著差異 (\*)，若兩組間之相符機率 $p < 0.01$ ，即示為非常顯著差異 (\*\*)。

## 3. 結果

### 3.1 相思樹胰蛋白酶抑制劑 (ACTI) 之純化

ACTI的純化方法是先將相思樹的種子洗淨，以0.01M 磷酸鹽緩衝液浸泡，利用組織均質機將種子打成泥狀，離心，取上清液，利用硫酸銨進行鹽析，將70%至95%飽和度硫酸銨沉澱的蛋白質對0.01M pH 8.0磷酸鹽緩衝液透析。透析後，離心將上清液通過Sephadex G-50管柱，陰離子交換樹脂DEAE-cellulose 52管柱，收集具有活性的部份，再通入trypsin-Sepharose 4B 親和性管柱，可得到純化的胰蛋白酶抑制劑。利用12% SDS-PAGE分析，可得到分子量約20 kDa的ACTI，經由DTT還原處理，可觀察到ACTI由A鏈及B鏈所組成 (圖一)。





**B**

Steps	Total Protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Purification (fold)	Yield (%)
Crude extract	2850	5680	2.0	1	100
Fraction 70-95%	420	3406	8.1	4.1	60.0
Sephadex G-50	212	2432	11.5	5.8	42.8
DEAE-cellulose 52	106	1832	17.2	8.6	32.3
Trypsin-Sepharose-4B	35	1470	42.0	21.0	25.9

圖1 以12% SDS-PAGE分析ACTI。A：Lane 1：Marker；Lane 2：經由trypsin-Sepharose 4B親和性管柱所純化的ACTI；Lane 3：ACTI經由DTT還原處理。B：由相思樹種子所分離出的ACTI純化倍數及回收率。

### 3.2 ACTI 對 SW480 細胞生長之影響

利用trypan blue dye exclusion assay來觀察ACTI對SW480細胞存活率的影響。取 $1 \times 10^5$  cell 置於6 cm dish 中，隔日將培養基換成不含FBS的培養基，分別加入不同濃度0.5、1、2、3、5、10  $\mu\text{M}$ 的ACTI，放置於 $37^\circ\text{C}$ ，5% $\text{CO}_2$ 培養箱培養24、48、72小時。透過trypan blue染色，於顯微鏡下進行計數，10  $\mu\text{M}$  ACTI處理24小時後，細胞存活率下降至約92.7%，處理48小時下降至 83.6%，處理72小時後下降至70%（圖2）。實驗結果顯示，隨著ACTI濃度及處理時間增加，SW480細胞的存活率逐漸減少。

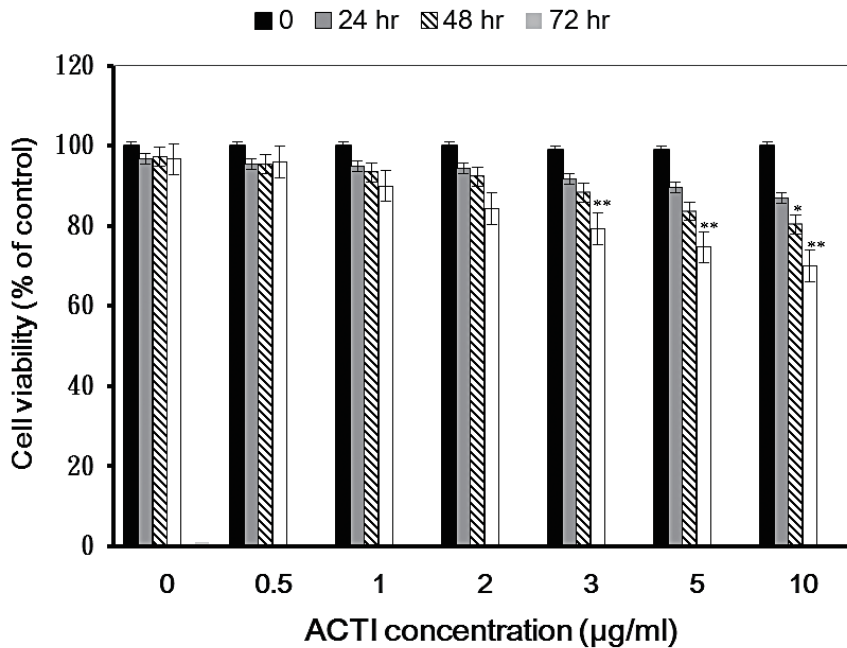


圖2 ACTI對SW480細胞存活率之影響。以不同濃度ACTI處理SW480細胞 24、48、72小時後，利用胰蛋白酶懸浮並收集細胞，加入PBS將細胞打散，最後加入trypan blue 混合後，透過血球計數盤進行細胞計數。數據是三重複之結果，以平均值±標準偏差值 (mean ± SD) 表示，\*: $p<0.05$ ，\*\*: $p<0.01$ 。

### 3.3 ACTI 誘導 SW480 細胞進行凋亡

利用annexin V-FITC apoptosis試劑分析ACTI誘導SW480細胞凋亡反應。在早期細胞凋亡時，磷脂絲胺酸 (phosphatidylserine) 會由細胞膜的內側翻轉至外側，故可利用annexin V對磷脂絲胺酸具有專一性的親和力來偵測細胞凋亡，當annexin V接上FITC螢光物質後，可藉由流式細胞儀偵測細胞是否進行凋亡。圖3為不同濃度的ACTI處理SW480 細胞 72小時後，以流式細胞儀進行凋亡分析，結果10  $\mu\text{M}$  ACTI處理72小時後，annexin V陽性的細胞明顯增加到27.98%。由此可知，ACTI能夠誘導SW480 cells 進行細胞凋亡。

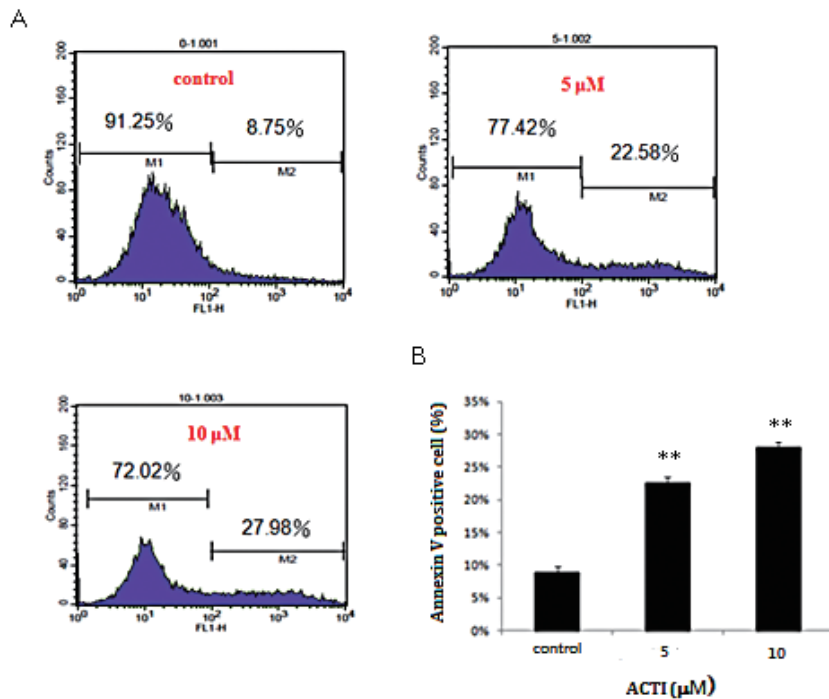


圖3 利用annexin V-FITC apoptosis分析細胞凋亡反應。A：以不同濃度ACTI處理SW480細胞 72小時後，利用胰蛋白酶懸浮並收集細胞，用binding buffer清洗細胞後，以annexin V 染色，透過流式細胞儀進行分析。M1為存活的細胞，M2為凋亡細胞。B：以M2（凋亡細胞）數據作統計分析。數據是三重複之結果，以平均值±標準偏差值 (mean ± SD) 表示，\*: $p<0.05$ ，\*\*: $p<0.01$ 。





### 3.4 ACTI 對 SW480 細胞之細胞凋亡相關蛋白質表現量之影響

以10  $\mu\text{M}$  ACTI處理SW480細胞48及72小時後，利用西方轉漬法分析與細胞凋亡相關性蛋白質的表現量，得知cleavage caspase-3蛋白質表現量分別上升11.55及14.60倍，cleavage caspase-9分別上升1.40及1.56倍，PARP含量分別下降0.87及0.45倍，cleavage PARP含量分別上升1.38及1.49倍，Bcl-2分別降至0.88及0.33倍，Bax蛋白質表現量分別上升1.65及1.93倍（圖4）。

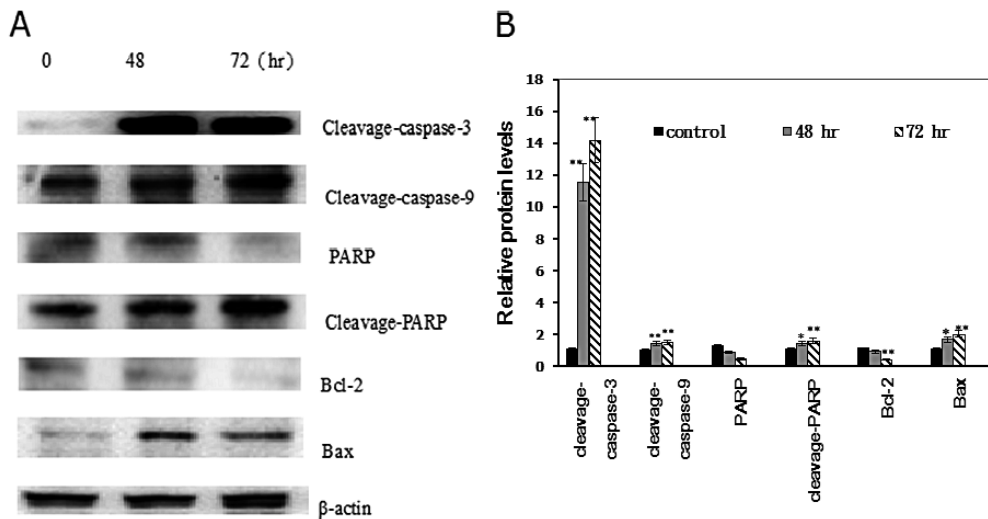


圖4 ACTI對SW480細胞之凋亡相關蛋白質表現量的影響。A：10  $\mu\text{M}$  ACTI處理SW480 細胞48、72小時後，收集蛋白並定量，以12% SDS-PAGE分離蛋白，將凝膠上的蛋白轉漬於PVDF膜上，進行西方轉漬法分析細胞凋亡相關蛋白質PARP、caspase-3、caspase-9、Bcl-2及Bax表現量的變化， $\beta$ -actin為internal control。B：利用imageJ軟體定量的結果。實驗統計結果是以平均值 $\pm$ 標準偏差值（mean  $\pm$  SD）表示（n=3），\*： $p < 0.05$ ，\*\*： $p < 0.01$ 。

### 3.5 ACTI 對 SW480 細胞中 cytochrome c 由粒線體釋出至細胞液的影響

cytochrome c原是粒線體呼吸鏈中重要的成員之一，若cytochrome c由粒線體釋放而出，會導致呼吸鏈的電子傳遞受到阻礙，因而產生大量的活性氧分子，並且降低ATP的生成。如此，粒線體不僅會釋放蛋白酶及內切核酸酶的活化因子，也會造成生物能量與氧化還原狀態的改變，這些特性使粒線體在執行細胞程式死亡的過程中扮演了重要的角色。圖5中ACTI處理SW480細胞48小時後，細胞液中cytochrome c的量比控制組增加約1.47倍，72小時後約



增加1.81倍。故可知ACTI誘導SW480 cells 走向凋亡路徑，是透過粒線體釋放出cytochrome c 導致細胞的凋亡。

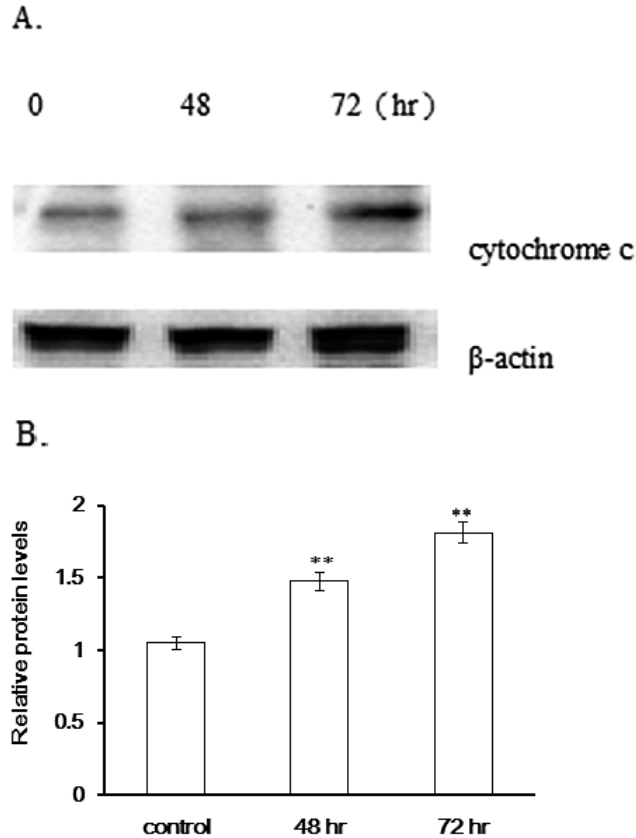


圖5 ACTI對SW480細胞中cytochrome c由粒線體釋出至細胞液之影響。A：10  $\mu$ M ACTI處理SW480細胞48、72小時後，收集蛋白並定量，以12% SDS-PAGE分離蛋白，將gel上的蛋白轉漬於PVDF上，進行西方轉漬法分析cytochrome c釋出至細胞液量的變化。 $\beta$ -actin為internal control。B：使用imageJ軟體將cytochrome c釋出至cytosol量定量的結果。實驗統計結果是以平均值 $\pm$ 標準偏差值 (mean  $\pm$  SD) 表示 (n=3)，\*: $p<0.05$ ，\*\*: $p<0.01$ 。



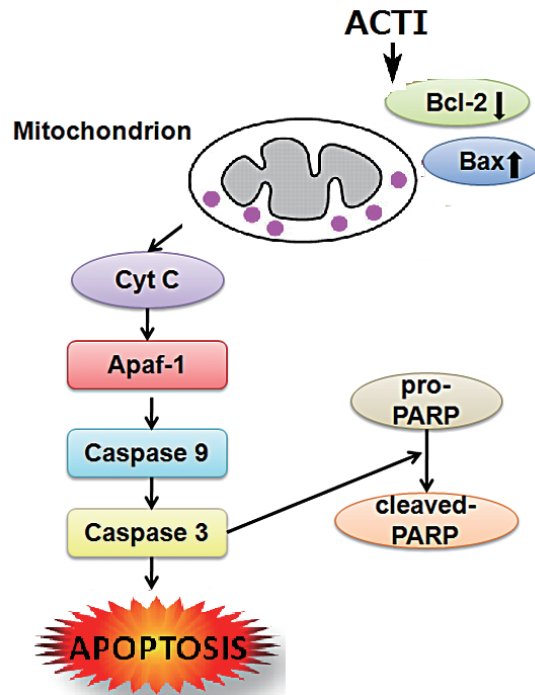


圖6 ACTI誘導SW480細胞進行細胞凋亡的訊號圖

#### 4. 討論

ACTI對於SW480 細胞生長的影响，首先以trypan blue dye exclusion assay偵測細胞存活率，隨著ACTI濃度及處理時間增加，細胞存活率明顯的下降；利用annexin V-檢測ACTI是否會誘導SW480 細胞進行apoptosis，annexin V對磷脂絲胺酸（phosphatidylserine）具高度親和性，當細胞進行細胞凋亡時，原本只存在細胞膜內側的磷脂絲胺酸會外翻到外側，外翻的磷脂絲胺酸會被annexin V辨識並結合，故在偵測細胞有無凋亡時可用此種蛋白作為辨識的工具（Chen et al., 2013；Pepping, 1999），結果中顯示ACTI處理SW480細胞72小時後，隨著ACTI濃度越高所偵測到的細胞凋亡有明顯上升的現象。

ACTI處理SW480細胞48、72小時，凋亡相關性蛋白質表現量有明顯變化，發現Bcl-2蛋白質表現量分別下降至0.88及0.33倍，Bax蛋白質表現量分別上升1.65及1.93倍，cleavage caspase-9分別上升1.40及1.56倍，cleavage caspase-3蛋白質表現量分別上升11.55及14.60倍，PARP含量分別下降0.87及0.45倍，cleavage PARP含量分別上升1.38及1.49倍，表示ACTI可誘導SW480細胞走向凋亡，其作用方式是經由粒線體相關的細胞凋亡途徑（內因式途徑）（Degli Esposti, 2004；Scheel-Toellner et al., 2004）。Bcl-2本身為凋亡抑制基因，是一種膜蛋白，而整個Bcl-2家族在粒線體參與的凋亡途徑中負責調控作用，能調控粒線體中



cytochrome c等凋亡因子釋放，雖然Bcl-2蛋白廣泛存在於粒線體膜、內質網膜以及外核膜上，位於粒線體外膜的Bcl-2才是主要拮抗促凋亡蛋白的功能。而大多數促凋亡蛋白則主要位於細胞質，一旦細胞受到凋亡因子的誘導，它們可以向粒線體轉位，通過寡聚化在粒線體外膜形成跨膜通道，或者開啟粒線體的PT孔，因而導致粒線體中的凋亡因子釋放，活化caspase的活性，導致細胞凋亡 (Kawai et al., 2007; Wertman et al., 2012)。Bcl-2阻止促細胞凋亡蛋白與粒線體結合，然而當BH3蛋白和Bcl-2結合後，會使其失去功能，導致Bax和Bak蛋白得以在粒線體上構成類似通道的結構，使cytochrome c釋出。cytochrome c和Apaf-1結合成Apaf-1/cytochrome c複合體，此複合體與ATP/dATP結合後，形成凋亡體 (apoptosome) 的次單元，七個次單元結合在一起，就組成了凋亡體。凋亡體能夠活化procaspase-9，形成具有活性的caspase-9 dimers，接著caspase-3會被活化成cleavage caspase-3進而切割poly ADP-ribose polymerase；PARP，使PARP片斷化。

在這研究中，發現ACTI可誘導SW480細胞進行凋亡是透過粒線體釋放出cytochrome c至細胞液中，進而導致細胞進行凋亡路徑 (圖6)。其他Kunitz-型胰蛋白酶抑制劑也已證實具有誘導不同癌細胞進行凋亡，如洋紫荊胰蛋白酶抑制劑可使得Hep G2 細胞形成凋亡體及粒線體去極化，因而進行細胞凋亡 (Fang et al., 2012)；巴西盾柱木 (*Peltophorum dubium*) 及大豆胰蛋白酶抑制劑可誘導人類淋巴球細胞株Jurkat細胞凋亡 (Troncoso et al., 2007)；台灣欒樹胰蛋白酶抑制劑抑制人類直腸癌細胞 (Hung et al., 2016)。ACTI可經由抑制MMP-2及MMP-9的分泌表現量而抑制HT-29大腸直腸癌細胞侵入性的能力 (Hung et al., 2014)；大豆胰蛋白酶抑制劑BBI可藉由抑制MAPK pathway中磷酸化ERK1/2的表現量下降而抑制MMP-2及MMP-9 mRNA 的表現，因此進一步抑制細胞分泌MMP-2及MMP-9，使uPA (urokinase plasminogen activator) 的表現量下降，且uPA 與癌症以及MMP導致的侵入轉移能力有著相當大的關係，因此造成細胞的侵入能力降低 (Chen et al., 2005)。

豆科植物種子內所含的蛋白酶抑制劑，不論是Kunitz型或Bowman-Birk型，都具有抗癌的作用。如豌豆，小扁豆 (lentil) 和大豆BBI處理結腸直腸腺癌細胞 (HT29, Caco2, LoVo)，使細胞存活率降低50%的BBI濃度 ( $IC_{50}$ ) 為32至73 $\mu$ M (Clemente and Arques Mdel, 2014)。ACTI抑制SW480細胞存活率效果的濃度較高 (10 $\mu$ M約70%存活)，因此，在未來的研究中可以將Kunitz型ACTI和Bowman-Birk型蛋白酶抑制劑合併治療 (combination therapy) 癌細胞，藉由兩種蛋白酶抑制劑可能有不同的作用機制，觀察是否會具有加乘的效果，是很值得進一步研究。



## 參考文獻

- [1] Bradford, M. M. (1976) Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, *72*, 248-254.
- [2] Brandl, T., Simic, O., Skaanderup, P. R., Namoto, K., Berst, F., Ehrhardt, C., Schiering, N., Mueller, I. & Woelcke, J. (2016) Trypsin inhibitors for the treatment of pancreatitis. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, *26*, 4340-4344.
- [3] Burger, M. M. (1970) Proteolytic enzymes initiating cell division and escape from contact inhibition of growth. *Nature*, *227*, 170-171.
- [4] Chen, Y. W., Huang, S. C., Lin-Shiau, S. Y. & Lin, J. K. (2005) Bowman-Birk inhibitor abates proteasome function and suppresses the proliferation of MCF7 breast cancer cells through accumulation of MAP kinase phosphatase-1. *Carcinogenesis*, *26*, 1296-1306.
- [5] Chen, L. Y., Sheu, M. T., Liao, C. K., Tsai, F. C., Kao, W. Y. & Su, C. H. (2013) Taiwanofungus camphoratus (*Syn Antrodia camphorata*) extract and amphotericin B exert adjuvant effects via mitochondrial apoptotic pathway. *Integrative Cancer Therapies*, *12*, 153-164.
- [6] Clemente, A. & Arques Mdel, C. (2014) Bowman-Birk inhibitors from legumes as colorectal chemopreventive agents. *World Journal of Gastroenterology*, *14*, 10305-10315.
- [7] Dabhade, A. R., Mokashe, N. U. & Patil, U. K. (2016) Purification, characterization, and antimicrobial activity of nontoxic trypsin inhibitor from *Albizia amara* boiv. *Process Biochemistry*, *51*, 659-674.
- [8] Degli Esposti, M. (2004) Mitochondria in apoptosis: past, present and future. *Biochemical Society Transactions*, *32*, 493-495.
- [9] Dias, L. P., Oliveira, J. T. A., Rocha-Bezerra, L. C. B., Sousa, D. O. B., Costa, H. P. S., Araujo, N. M. S., et al. (2017) A trypsin inhibitor purified from *Cassia leiandra* seeds has insecticidal activity against *aedes aegypti*. *Process Biochemistry*, *57*, 228-238.
- [10] Eatemadi, A., Aiyelabegan, H. T., Negahdari, B., Mazlomi, M. A., Daraee, H., Daraee, N., et al. (2017) Role of protease and protease inhibitors in cancer pathogenesis and treatment. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *86*, 221-231.
- [11] Fang, E. F., Bah, C. S. F., Wong, J. H., Pan, W. L., Chan, Y. S., Ye, X. J., et al. (2012) A potential human hepatocellular carcinoma inhibitor from *Bauhinia purpurea* L. seeds: from purification to mechanism exploration. *Archives of Toxicology*, *86*, 293-304.
- [12] Gotor, C., Pintor-Toro, J. A. & Romero, L. C. (1995) Isolation of a new member of the soybean Kunitz-type proteinase inhibitors. *Plant Physiology*, *107*, 1015-1016.



- [13] Hung, C. H., Wu, C. C. & Wang, H. L. (2014) Inhibition of invasion in human colon adenocarcinoma cells by *Acacia confusa* trypsin inhibitor. *Journal of Health Management*, 12, 48-60.
- [14] Hung, C. H., Dong, C. F. & Wang, H. L. (2016) Inhibition of growth in human colon adenocarcinoma cells by *Koelreuteria formosana* trypsin inhibitor. *Journal of Health Management*, 14, 56-66.
- [15] Kawai, H., Suzuki, T., Kobayashi, T., Ishii-Watabe, A., Sakurai, H., Ohata, H., et al. (2007) Caspase cascade proceeds rapidly after cytochrome c release from mitochondria in tumor necrosis factor-alpha-induced cell death. *Journal of Pharmacological Sciences*, 103, 159-167.
- [16] Kennedy, A. R. & Wan, X. S. (2002) Effects of the Bowman-Birk inhibitor on growth, invasion, and clonogenic survival of human prostate epithelial cells and prostate cancer cells. *Prostate*, 50, 125-133.
- [17] Lin, J. Y., Chu, S. C., Wu, H. C. & Hsieh, Y. S. (1991) Trypsin inhibitor from the seeds of *Acacia confusa*. *Journal of Biochemistry*, 110, 879-883.
- [18] Mi, Q., Lantvit, D., Reyes-Lim, E., Chai, H., Phifer, S. S., Wani, M. C., et al. (2005) Apoptotic anticancer effect of alvaradoin E isolated from *Alvaradoa haitiensis*. *Anticancer Research*, 25, 779-787.
- [19] Nakahata, A. M., Bueno, N. R., Rocha, H. A., Franco, C. R., Chammas, R. & Nakaie, C. R. (2006) Structural and inhibitory properties of a plant proteinase inhibitor containing the RGD motif. *International Journal of Biological Macromolecules*, 40, 22-29.
- [20] Odani, S. & Ikenaka, T. (1978) Studies on soybean trypsin inhibitors. IV. Change of the inhibitory activity of Bowman-Birk inhibitor upon replacements of the alpha-chymotrypsin reactive site serine residue by other amino acids. *Journal of Biochemistry*, 84, 1-9.
- [21] Pandey, P. K., Singh, D., Singh, R., Sinha, M. K., Singh, S. & Jamal, F. (2016) Cassia fistula seed's trypsin inhibitor(s) as antibiosis agent in *Helicoverpa armigera* pest management. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 6, 202-208.
- [22] Pepping, J. (1999) Phosphatidylserine. *American Journal of Health-System Pharmacy*, 56, 2038-2043.
- [23] Rasouli, H., Parvaneh, S., Mahnam, A., Rastegari-Pouyani, M., Hoseinkhani, Z. & Mansouri, K. (2017) Anti-angiogenic potential of trypsin inhibitor purified from *Cucumis melo* seeds: homology modeling and molecular docking perspective. *International Journal of Biological Macromolecules*, 96, 118-128.
- [24] Scheel-Toellner, D., Wang, K. Q., Webb, P. R., Wong, S. H., Craddock, R., Assi, L. K., et al.





- (2004) Early events in spontaneous neutrophil apoptosis. *Biochemical Society Transactions*, 32, 461-464.
- [25] Tripathi, V. R., Sahasrabudhe, A. A., Kumar, S. & Garg, S. K. (2014) Purification and characterization of a trypsin inhibitor from *Senna tora* active against midgut protease of podborer. *Process Biochemistry*, 49, 347-355.
- [26] Troncoso, M. F., Biron, V. A., Longhi, S. A., Retegui, L. A. & Wolfenstein-Todel, C. (2007) *Peltophorum dubium* and soybean Kunitz-type trypsin inhibitors induce human jurkat cell apoptosis. *International Immunopharmacology*, 7, 625-636.
- [27] Twiddy, D., Brown, D. G., Adrain, C., Jukes, R., Martin, S. J., Cohen, G. M., et al. (2004) Pro-apoptotic proteins released from the mitochondria regulate the protein composition and caspase-processing activity of the native Apaf-1/Caspase-9 apoptosome complex. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 19665-19682.
- [28] Watanapokasin, R., Jarinthanan, F., Nakamura, Y., Sawasjirakij, N., Jaratrungtawee, A. & Suksamrarn, S. (2011) Effects of alpha-mangostin on apoptosis induction of human colon cancer. *World Journal of Gastroenterology*, 17, 2086-2095.
- [29] Wertman, J., Lord, C. C., Dauphinee, A. N. & Gunawardena, A. H. (2012) The pathway of cell dismantling during programmed cell death in lace plant (*Aponogeton madagascariensis*) leaves. *BMC Plant Biology*, 12, 115.
- [30] Worowski, K. & Roszkowska, W. (1979) Protease inhibitors in potatoes. *Postepy Biochemii*, 25, 229-246.

