

R
008.8
4414

中山醫學院生物化學研究所

碩士論文

指導教授：謝易修 博士 (Yih-Shou Hsieh Ph.D.)

第一部份：人類乳房組織中 MMP-2 的活化和癌轉移之間的相關性
Correlation between MMP-2 activation and tumor metastatic
progression in human breast cancer

第二部份：老鼠肉瘤細胞(Sarcoma 180)中蛋白酶之活化與
Bowman-Birk 和 Kunitz 蛋白酶抑制劑的關係
Proteolytic activities in mouse sarcoma 180 cells that were inhibited
by the Bowman-Birk and Kunitz protease inhibitors

第三部份：大葉合歡胰蛋白酶抑制劑 cDNA 的選殖、定序和
其初級結構分析
Nucleotide sequence of cDNA for *Albizza lebbek* trypsin inhibitor
and its deduced primary structure

第四部份：在假懷孕雌鼠之子宮蜕膜瘤發育中 MMP-2 的活化和
細胞增生的相關性
Activation of MMP-2 associated with the cell proliferation during
the development of deciduomata in pseudopregnant rats

研究生：林麗娟 (Li-Jen Lin) 撰

中華民國八十六年七月



參考書恕不外借

授權書

(博碩士論文)

本授權書所授權之論文為本人在 中山醫學院 生物化學研究所
組 85 學年度第 2 學期所撰 碩士 學位論文。

論文名稱：a. 人類乳癌組織中MMP-2的活化和癌轉移之間的相關性；
b. 老鼠肉瘤細胞(Sarcoma 180)中蛋白酶之活化與Bowman-Birk和
Kunitz蛋白酶抑制劑的關係；
c. 大葉合歡胰蛋白酶抑制劑cDNA的選殖、定序和其初級結構分析；
d. 在假懷孕雌鼠之子宮蛻膜瘤發育中MMP-2的活化和細胞增生的相關性；

同意 不同意

本人具有著作財產權之論文提要，授予國家圖書館、本人畢業學校及行政院
國家科學委員會科學技術資料中心，得重製成電子資料檔後收錄於該單位之
網路，並與台灣學術網路及科技網路連線，得不限地域時間與次數，以光碟
或紙本重製發行。

同意 不同意

本人具有著作財產權之論文全文資料，授予行政院國家科學委員會科學技術
資料中心，得不限地域時間與次數以微縮、光碟重製後發行，並得享該中心
微縮小組製作之研究報告、獎勵代表作、博碩士論文三檔資料等值新台幣伍
佰元之服務。本論文因涉及專利等智慧財產權之申請，請將本論文全文延後
至民國 90 年 10 月後再公開。

同意 不同意

本人具有著作財產權之論文全文資料，授予教育部指定送繳之圖書館及本人
畢業學校圖書館，為學術研究之目的以各種方法重製，或為上述目的再授權
他人以各種方法重製，不限時間與地域，惟每人以一份為限。

上述授權內容均無須訂立讓與及授權契約書。依本授權之發行權為非專屬性發行
權利。依本授權所為之收錄、重製、發行及學術研發利用均為無償。

指導教授姓名：謝易修

研究生簽名：林麗娟 學號：R84213
(親筆正楷)

日期：民國 86 年 7 月 8 日

備註：1. 上述同意與不同意之欄位若未勾選，本人同意視同授權。
2. 授權第二項者，請再交論文一本予承辦人員。
3. 本授權書已於民國85年4月10日送請著委會修正定稿。

簽署人須知

1. 依著作權法的規定，任何單位以網路、光碟與微縮等方式整合國內學術資料，均須先得到著作財產權人授權，請分別在三種利用方式的同意欄內鈎選並填妥各項資料。
2. 所謂非專屬授權是指被授權人所取得的權利並非獨占性的使用權，授權人尚可將相同的權利重複授權給他人使用；反之即為專屬授權，如果您已簽署專屬授權書予其他法人或自然人，請勿簽署本授權書。
3. 授權人的權利與義務：
在美國授權博碩士論文予UMI公司(博碩士論文全文資料發行公司)製作發行，須交付美金45元的出版費，銷售年逾七件以上時得享收入10%的權利金約美金20元；在國內本計畫之經費全數由政府支應，收入亦應歸國庫，為答謝您的支持，科資中心特為您提供新台幣500元的等值資料服務(以研究報告、獎勵代表作、博碩士論文三檔為限)，請逕洽本案聯絡人，地址電話詳如第5項。義務方面唯一要注意是，著作人日後不可以主張終止本授權書，但您仍可以授權其他自然人或法人上述的行為。
4. 全國博碩士論文全文資料微縮片整合計畫的宏觀效益：
在個人方面，您的論文將可永久保存(微縮技術在理論上可保存八百年，實證已逾百年)，也因為您的授權，使得後進得以透過電腦網路與光碟多管道檢索，您的論文將因而被充分利用。在國家總體利益方面，紙本容易因影印而造成裝訂上的傷害，圖書館中孤本的公開陳列與外借也有破損之虞，唯有賴政府全面性的整合，借助科技設備才能一舉完成保存與利用的全方位效益，回憶您過去尋找資料之不便經驗，學弟與學妹確實須要您的論文與授權書。
5. 本案聯絡電話：(02)7377746 江守田、王淑貞
地址：台北市和平東路二段106號17樓1702室

研究生姓名：林麗娟 聯絡電話：(04) 2654661

地址：台中市南屯路177-2號10F三2

本論文為中山醫學院授予理學碩士學位之
必備條件之一，經中山醫學院生物化學研究所碩
士論文考試委員會審查合格及口試通過。

口試委員

中台醫專食品衛生科主任

朱淑珍 博士

朱淑珍

中山醫學院生物化學研究所

劉哲育 博士

劉哲育

中山醫學院生物化學研究所
(論文指導教授)

謝易修 博士

謝易修

中華民國八十六年六月

學生林麗娟論文題目為第一部份：人類乳房組織中 MMP-2 的活化和癌轉移之間的相關性；第二部份：老鼠肉瘤細胞 (Sarcoma 180) 中蛋白酶之活化與 Bowman-Birk 和 Kunitz 蛋白酶抑制劑的關係；第三部份：大葉合歡胰蛋白酶抑制劑 cDNA 的選殖、定序和其初級結構分析；第四部份：在假懷孕雌鼠之子宮蛻膜瘤發育中 MMP-2 的活化和細胞增生的相關性，其論文已經中山醫學院生物化學研究所碩士論文考試委員會審查合格及口試通過，並由其指導教授核閱後無誤。

指導教授：謝易修 博士

簽名：

謝易修

中華民國 年 月 日

誌 謝

感謝在這兩年研究所生活中不斷關懷和鼓勵我的老師、同學以及學弟學妹們，一切感恩和感激盡在不言中，再次謝謝大家！

最後要特別感謝我的家人對我的支持和愛護！

謝 謝 大 家 ！ ！

目 錄

第一部份：人類乳房組織中 MMP-2 的活化和癌轉移之間的相關性	1
中文摘要	2
英文摘要	3
緒言	4
縮寫	11
實驗材料	12
實驗方法	13
實驗結果	23
討論	28
圖表與圖表說明	31
參考文獻	46
第二部份：老鼠肉瘤細胞(Sarcoma 180)中蛋白脢之活化與 Bowman-Birk 和 Kunitz 蛋白脢抑制劑的關係	51
中文摘要	52
英文摘要	53
緒言	54
實驗方法	60
實驗結果	64
討論	70
圖表與圖表說明	72
參考文獻	87

第三部份：大葉合歡胰蛋白酶抑制劑 cDNA 的選殖、定序和其初級結構分析92

中文摘要.....	93
英文摘要.....	94
緒言.....	95
縮寫.....	100
實驗材料.....	101
實驗方法.....	102
實驗結果.....	112
討論.....	114
圖表與圖表說明.....	117
參考文獻.....	130

第四部份：在假懷孕雌鼠之子宮蛻膜瘤發育中 MMP-2 的活化和細胞增生的相關性136

中文摘要.....	137
英文摘要.....	138
緒言.....	139
實驗方法.....	146
實驗結果.....	150
討論.....	155
圖表與圖表說明.....	157
參考文獻.....	175

第一部份：

人類乳房組織中 MMP-2 的活化和癌轉移之間的相關性

Correlation between MMP-2 activation and tumor metastatic
progression in human breast cancer

中山醫學院生物化學研究所

指導教授：謝易修 博士(Yih-Shou Hsieh, Ph.D.)

研究生：林麗娟 (Li-Jen Lin)

中文摘要

72 kd gelatinase proenzyme (matrix metalloproteinase-2, MMP-2)的活化態 62 kd gelatinase 被認為在腫瘤的侵襲和轉移中扮演一個重要的角色。利用 Zymography 的方法已經證明在乳癌組織中有 62 kd gelatinase 的活性表現增加，但卻無法證實 62 kd gelatinase 的表現和腫瘤轉移之間的關連。因此我們進一步的研究 62 kd gelatinase 在人類乳癌中的表現。我們利用 Zymography 的方法偵測 38 個乳癌病人的乳癌組織和乳癌鄰近的正常組織中 62 kd gelatinase 的活性。然而我們處理樣本的方式不似先前研究的方法，而是將組織利用 PBS (phosphate-buffered saline) 研磨取細胞質層進行分析。結果顯示在腫瘤中 62 kd gelatinase 活性的表現範圍從很強的 band ($1126 \text{ INT} \times \text{mm}^2$) 到很微弱的 band ($37 \text{ INT} \times \text{mm}^2$) 都有，但在鄰近的正常組織中只有少量甚至沒有活性的表現。而在 62 kd gelatinase 的表現量和病人有無淋巴結轉移的情況之間有一非常顯著的差異。這個結果證實：62 kd gelatinase 在人類乳癌組織中比鄰近正常組織表現量有提高的現象。另外我們也更深入的探討 62 、 72 kd gelatinase 的特性。62 、 72 kd gelatinase 的 optimal pH 在 pH 8，且為 metalloproteinases，以 Ca^{2+} 為 cofactor 而 Zn^{2+} 則有抑制 62 、 72 kd gelatinase 活性的效果，而且 Thermolysin 會將 72 kd gelatinase 切成 62 kd gelatinase。因此 62 kd gelatinase 可被視為診斷人類乳癌中腫瘤轉移的重要指標。

英文摘要

The 62-kd gelatinase is the activated form of the 72-kd gelatinase (matrix metalloproteinase-2, MMP-2) proenzyme and considerable to be the aritical point in tumor invasion and metastasis. Zymography studies have measured the increased 62-kd gelatinase activity in breast cancer tissue, but have failed to demonstrate the association between the expression of 62-kd gelatinase and tumor metastasis. The purpose of this study was further to examine the expression of 62-kd gelatinase in human breast cancer. We measured the activity of 62-kd gelatinase in 38 samples of breast cancer and adjacent normal breast tissue using gelatin zymography. Unlike previous sample preparation, the homogenization buffer was performed by phosphate-buffered saline (PBS). Expression of the 62-kd gelatinase ranged from a strong band ($1126 \text{ INT} \times \text{mm}^2$) to the presence of only little amount ($37 \text{ INT} \times \text{mm}^2$) of enzyme in the tumor tissue, with little or none detectable in the adjacent normal tissue. There was a significant statistical correlation between the level of expression of the 62-kd gelatinase and occupancy of lymph node metastasis. These results demonstrate elevated expression of 62-kd gelatinase in human breast cancer tissue relative to adjacent normal tissue. These results indicate that the 62-kd gelatinase would be considered as a potential marker for the diagnosis of tumor metastasis in the human brease cancer.

緒 言

今日科學昌明，物質文明極為發達，可是人類對於可怕的疾病—『癌症』還是力不從心不能有效治療。儘管科學家們對於癌症的研究投下無以累計的精神、時間、金錢和努力，可是至今大多數癌症的真正成因尚無法究明，因此也就談不上有根本治療的方法。自1982年開始，國內癌症死亡率已超越心臟血管疾病，躍居首位。由於生活品質的提昇，飲食習慣的改變，隨之而來的是癌症種類歐美化及癌症發生率的不斷上升。據1997年衛生署公佈84年國人的癌症報告，平均每十萬人就有一百零七人死於癌症，男性以肝癌為首，女性則是肺癌，乳癌雖居第五位，但卻是死亡人數增加率最快速，比往年增加了13.14%，而在86年乳癌更躍居第二名。另一個不尋常之現象為乳癌患者有年輕化趨勢。國內女性乳癌好發於35—54歲(55.3%)，而歐美地區的女性乳癌卻有三分之二發生在停經後，二者平均年齡有十歲之差，其原因尚待偵查。針對國內女性罹患乳癌每年大約有700—900個病歷的情況，除了加強預防和治療外，腫瘤分期與偵測的方法也需齊頭並進。目前乳癌癌化行為的偵測以淋巴結轉移為最佳的偵測指標，其它如型態上和生化上的變化，也是偵測的重點。但是這些仍然不足以指示乳癌癌化的專一性，所以尋求更多有關乳癌惡化的指標是目前迫切的工作。

腫瘤(tumor)：在身體的某一部位形成的一個細胞集團，此細胞集團與周圍的細胞組織不同，並且是具有自律性(autonomy)的細胞。腫瘤可分為良性腫瘤與惡性腫瘤二種。

所謂癌(cancer)，其廣義的意義是指惡性腫瘤。惡性腫瘤的主要特徵是可以侵入周圍的組織(invasion)，並且可以轉移到遠處的其他組織(metastasis)，而在其它組織增殖最後導致宿主死亡。然癌細胞不會

直接傷害宿主致死，癌症的直接死因是感染，而其中此種感染的大部是由於對抗生素有抵抗性之細菌所引起的，其次是流血與血管阻塞，再者是癌細胞增殖以致於侵犯鄰近器官引起器官失能(organ failure)、呼吸失能以及心肌不足(Julian L. Ambrus 等的報告)。

腫瘤細胞的生長一般分成四個階段(1)侵襲 (invasive)：惡性腫瘤細胞，猶如細沙般很容易擴散，此種擴散出來的癌細胞就侵入周圍的正常組織 (2)血管生成 (angiogenesis)：微血管上皮細胞包圍腫瘤組織並且增殖。癌組織爲了繼續成長，必需有補給營養的通道，一般相信，癌組織本身有誘導血管形成的能力。事實上，我們可以發現腫瘤組織較正常組織有更豐富的血管組織 (3)滲入血管 (intravastion)：癌細胞能分泌可破壞周圍正常組織的分解酵素，而使腫瘤細胞能滲入微血管床 (capillary bed) (4)腫瘤細胞從血管滲入組織和轉移 (extravasation & metastasis)：癌細胞藉著血管系統運行的血液性轉移 (hematogenous metastasis) 與藉淋巴系統運行的淋巴性轉移 (lymphogenous metastasis)，而運行到較遠的組織或器官之後再滲出血管進入標的，以進行其非連續性的分裂增殖發育⁽¹⁾。

從臨床的觀點而言，癌症發展最嚴重的狀態就是侵襲和轉移，癌細胞一旦轉移往往是群醫束手無策，只能苟延殘喘一段時間最後仍註定一死。因此，癌症研究的一個主題就是偵測癌細胞早期的轉移。轉移的過程是一個極端複雜的現象，它包括一系列的連續步驟，其中就是分泌蛋白酵素除去細胞外基質，以便癌細胞的侵略和轉移⁽⁵⁾。

然而分解細胞外基質也同樣發生在一些正常的生理狀況，如胚胎的發育(embryo morphogenesis)⁽²⁾，囊胚的著床⁽³⁾，血管生成和組織重建^(4,2)。

一、細胞外基質(extracellular matrices)可分成二種：甲.基底膜

(basement membranes, BM) 乙.細胞組織間隙的結締組織 (interstitial connective tissue)

甲.基底膜

基底膜是由基板(basal lamina)、基質、網狀纖維三層所組成。所有上皮組織在與底下結締組織相接觸的面有一連續成一片樣的構造，稱之為基底膜。而基板是一薄片的顆粒層由很細的微纖維包含一細緻的網狀結構而成，已知含有膠原蛋白質(以 type-IV 膠原蛋白質為主)和一些不定形蛋白質(多醣類複合物)。網狀纖維和基板相似，但膠原蛋白質是以 type-III 為主。在基底膜下面尚有以 type-I 膠原蛋白質為主的厚纖維結構。

基底膜分佈在身體每個地方，主要是用來分離細胞組織間隙的結締組織之外皮和內皮之器官。而基底膜也作為細胞生長的地基以及維持組織的方向性。在胚胎分化時期的細胞增生和許多 *in vivo* 的再生過程如上皮的形成和神經的再生^(6,7)中，也提供了定向的功能，基底膜另外一個功能就是過濾巨大分子。

基底膜的主要成份是：(1) type-IV 膠原蛋白質：分子結構 $(\alpha 1(IV))_2\alpha 2(IV)$ ，特徵⇒為基底膜特殊且主要的成份，用來形成網狀結構並且是細胞接觸的蛋白，會和 heparan sulfate proteoglycan、fibronectin 有交互作用 (2) laminin：分子結構 A,B1,B2，特徵⇒為基底膜特殊的成份，可以幫助細胞結合到基質上，laminin 尚可和特殊的細胞膜蛋白結合以及和 proteoglycan、entactin 有交互作用 (3) heparan sulfate：分子結構 core protein 和 3-6 個側鏈，特徵⇒與 type-IV 膠原蛋白質、laminin、fibronectin 有交互作用，可能具有過濾巨大分子的功能 (4) chondroitin sulfate：分子結構 core protein 和 6 個側鏈 (5) entactin：分子結構單一側鏈，特徵⇒為基底膜特殊的成份且會與 laminin 有交互作用

乙.細胞組織間隙的結締組織

是由細胞 fibroblasts、osteoblasts、chondrocytes 和 macrophages 所構成的，其可分成幾種類型：腱(tendons)、骨(bone)、筋膜(fasciae)、鬆的基質(loose stroma)、韌帶(ligaments)。其廣泛分佈在身體的膠原纖維和 glycoprotein、proteoglycan、hyaluronic acid ground substance 所形成的網狀組織中，主要是作為支撐作用。⁽⁶⁾

二、癌細胞的轉移需要額外基因層次的改變，如對細胞外基質高度的親和力，高度的細胞移動性以及增加分解蛋白的活性(proteolytic activity)。癌細胞首先透過細胞表面的 laminin binding protein 與基底膜的 laminin(一種 glycoprotein)接觸⁽⁸⁾，接著將 metalloproteinase cascade 啟動，於是 type-IV 膠原蛋白酶⁽⁹⁾產生，而將基底膜的 type-IV 膠原蛋白質網狀結構分解掉，癌細胞就可以穿越基底膜而移動。

而參與癌細胞之侵襲和轉移時分解蛋白的蛋白酶素可分成四大類：

1. serine - 蛋白酶素：如 plasminogen activators、plasmin 和 elastase
2. cysteine - 蛋白酶素：如 cathepsin B 和 cathepsin L
3. metalloproteinase：包含三種 a. interstitial collagenase
b. type-IV 膠原蛋白質 c. stromelysin
4. aspartyl - 蛋白酶素：如 cathepsin D

在最近許多重要的研究指出 MMPs 的表現和許多腫瘤如 breast⁽¹⁰⁾、colorectal^(11,12) 以及 gastric^(14,15) carcinomas 有關連。

三、MMPs 家族成員

甲、可分成三類：

1. a. interstitial 膠原蛋白酶 (type-I 膠原蛋白酶、MMP-1)：以

- 52、57 kd 被分泌出，活化態分子量為 52 kd，可分解 type-I, II 及 III 膠原蛋白質⁽¹⁵⁾
- b. PMN 膠原蛋白質酶 (MMP-8)：以 75 kd 被分泌出，可分解 type-I, II 及 III 膠原蛋白質⁽¹⁶⁾
- 2. a. 72 kd type-IV 膠原蛋白質酶 (72 kd gelatinase、MMP-2)：以 72 kd 被分泌出，活化態分子量為 62 kd，可分解 type-IV, V 及 VII 膠原蛋白質、fibronectin、gelatins⁽¹⁷⁾
- b. 92 kd type-IV 膠原蛋白質酶 (92 kd gelatinase、MMP-9)：以 92 kd 被分泌出，活化態分子量為 82 kd，可分解 type-IV 及 V 膠原蛋白質、gelatins⁽¹⁸⁾
- 3. a. stromelysin (transin、proteoglycanase、procollagen-activating factor、MMP-3)：以 57、60 kd 被分泌出，活化態分子量為 53 kd，可分解 proteoglycans、laminin、fibronectin、type-III, IV 及 V 膠原蛋白質、gelatins⁽¹⁹⁾
- b. stromelysin-2 (transin-2、MMP-10)：活化態分子量為 53 kd，可分解 type-III, IV 及 V 膠原蛋白質、fibronectin、gelatins⁽²⁰⁾
- c. PUMP-1 (MMP-7、small metalloproteinase of uterus)：以 28 kd 被分泌出，活化態分子量為 28 kd，可分解 fibronectin、gelatins⁽²¹⁾

乙、MMPs 家族有幾項特徵：

1. 催化的機制需要 Zn^{2+}/Ca^{2+} 位於活性中心
2. MMPs 是以 Zymogen 的方式被分泌出來
3. Zymogen 需要藉由蛋白酵素 organomercurials 來活化
4. 活化態的 MMPs 會比未活化的 MMPs 少掉約 10 kd 的分子量
5. MMPs 的 cDNA 序列相似於膠原蛋白質酶
6. MMPs 可以分解一種以上的細胞外基質成份
7. MMPs 的活性可以被 TIMP (tissue inhibitor of metalloproteinase) 所抑制
8. MMPs 成員間的胺

基酸次序之相似性很高

丙、MMPs 在生理狀況可受二種不同的方式調控：

1. 轉錄層面的調控 (transcriptional regulation)：

MMPs 的基因並非 constitutively expressed，但可以受到一些生物性活化劑如荷爾蒙、生長因子、oncogenes、cytokines 和 tumor promoters 的正調節。然而這正向的誘發可以被其他的生物性關聯的作用者如 steroids 和 transforming growth factor-beta 所抑制。

在癌細胞中 MMPs 量的提高，可能肇因於活化態的 oncogene 存在的結果。例如 Ha-ras oncogene，其和許多人類和動物的腫瘤有關連，是個有效的 Type-IV 膠原蛋白質酶/gelatinase，stromelysins 之誘發者(inducer)。(22)

2. MMPs 活性層面的調節：

(1) 受 plasmin 的活化：plasminogen 由 plasminogen activators 活化成 plasmin，plasmin 再參與以 latent form 被分泌釋出的 MMPs 活化的 pathway (2) 受 stromelysin 的活化：已活化的 stromelysin 以

superactivate MMPs，使 MMPs 比活化態的活性更高出 5-8 倍 (3) 受 TIMP 的抑制：活化的 MMPs 會去分解細胞外基質的成份，然而此時的 MMPs 活性會被 TIMP 所抑制。

推測 MMPs 之 latent form 中的 prodomain 可能纏繞折疊著，所以在保留區 PRCGVDPV 的 cysteine 可以和 Zinc 分子形成複合物。MMPs 的活化劑顯示可以使 prodomain 有結構上的改變，於是就破壞了 cysteine - Zinc 之間的交互作用，並且將 Zinc 釋出，此 Zinc 就可以參加 MMPs 分解蛋白的反應。此種狀態的 MMPs 就有能力進行 autoproteolysis 以移走 N 端的 prodomain(包括 PRCGVDPV 序列)，接著便改變成活化狀態⁽²²⁾。

四、MMP-2 與腫瘤

在許多的系統中⁽²³⁾，MMP-2 顯然與腫瘤的侵襲和轉移有關，如利用 immunohistochemical 和 mRNA hybridization⁽²⁴⁾ 偵測人類乳癌，發現有 MMP-2 表現量增加。而在 immunoreactivity 中 MMP-2 出現在人類乳癌的侵襲區⁽²⁵⁾，而活化態的 MMP-2 主要是在人類乳癌的 extracts 中⁽²⁶⁾，zymography 的定量也證明活化態的 MMP-2 和乳癌的惡化有關⁽²⁷⁾，由以上觀察可知 MMP-2 的表現和人類乳癌的惡化情況有關連。

而在最近的研究中更進一步的指出，MMP-2 的活化可以增加人類乳癌轉移的潛能。在許多的證據顯示，人類乳癌細胞以及在裸鼠中的 MMP-2 在膜上被活化的潛能和轉移的能力有關(*in vitro*)^(30,31)。MMP-2 的活化過程是利用 MT-MMP⁽²⁸⁾ 或一些蛋白酶將 72 kd 改變成 62 kd。而在高度具侵襲能力的人類乳癌細胞株中 Con A 可誘發 MT-MMP 的表現⁽²⁹⁾。因此 MMP-2 的活化可能和人類乳癌轉移惡化有關。

五、研究動機

62 kd gelatinase 的活性在具侵襲性的人類乳癌中也有增加的現象⁽³²⁾，並且乳癌組織中比在鄰近的正常組織中表現量較高，這些結果都顯示了 62 kd gelatinase 增高的量和人類乳癌轉移惡化有關連，但卻無法進一步證實此種現象和惡化轉移或病理上的惡化潛能有什麼樣的關連性。因此我們利用 zymography 檢測 38 個病人的乳癌和正常組織之 62 kd gelatinase 的表現。希望能對於這個關連性做個合理的解釋。我們參考 Billings⁽³³⁾ 的 cytosol 萃取以 PBS 研磨組織。因為此酵素以 free and/or flashy 存在於 extracellular matrix 和 intracellular plasma。

縮 寫

BBI	: Bowman-Birk inhibitor
ACTI	: <i>Acacia confusa</i> trypsin inhibitor
RCTI	: <i>Ricinus communis</i> trypsin inhibitor
ALTI	: <i>Albizzia lebbek</i> trypsin inhibitor
DLTI	: <i>Dolichos lablab</i> trypsin inhibitor
PMSF	: Phenyl methyl-sulfonyl fluoride
DFP	: diisopropyl fluorophosphate
TLCK	: N α -P-tosyl-L-lysine chloromethyl ketone
TPCK	: N-tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone
EDTA	: Ethylene diamine tetraacetic acid
SDS	: Sodium dodecyl sulfate
TEMED	: N,N,N',N' -Tetramethylene diamine
Tris	: Tris (hydroxymethyl)-aminomethane
BSA	: Bovine serum albumin
FPLC	: Fast performance liquid chromatography
TIMP	: Tissue inhibitor of metalloproteinase
S180	: Sarcoma 180 cell
P	: Proestrus
E	: Estrus
M	: Metestrus
D	: Diestrus

實驗材料

1. 人類乳癌組織以及乳癌鄰近的正常組織，由中部某兩家醫院所提供
2. S180 細胞為本實驗室在小白鼠腹腔中培養
3. 小白鼠購自榮民總醫院台中分院動物中心
Sprague-Dawley 雌鼠購自 National Science Council Animal Center,
Taipei Taiwan, ROC
4. ACTI、ALTI、DLTI 為本實驗室純化
5. Acrylamide 購自美國 Sigma 公司
6. Bio-Rad protein assay dye reagent 購自美國 Bio-Rad 公司
7. Coomasie brilliant blue R250 購自德國 Serva 公司
8. Gelatin (Porcine type A) 購自美國 Sigma 公司
9. Sodium dodecyl sulfate 購自德國 Serva 公司
10. Trypsin (type III, from bovine pancreas)、Chymotrypsin、
Thermolysin、Nargase 購自美國 Sigma 公司
11. PMSF、TLCK 購自美國 Sigma 公司
12. TPCK 購自美國 Aldrich chem. 公司
13. Tris 購自德國 E. Merck 公司
14. 儀器
Amersham Life Science Hybridization Oven/Shaker
Beckman DU 640 Spectrophotometer
Beckman GS-6R Centrifuge
Bio-Rad Mini-Protean II
Fargo 旋轉動力器
Hybrid HB-SHK 1 Shaker
Wheatopn 細胞研磨器

實驗方法

1. 檢體的收集

- 1) 由外科乳房切除手術所獲得的人類乳癌組織和相對部份的正常乳房組織(指接近切除邊緣的正常組織), 是由中部某兩家醫院開刀房所提供
- 2) 檢體冷凍並且放入液態氮中保存
- 3) 檢體是按照正常的手術處置所獲得, 並不會對病人有任何的危險。同時由於需使用病人的資料來解釋生化和分子生物的數據, 所以採取匿名的方式

2. 組織研磨液的製備

所有的操作都在 4 °C 下完成

- 1) 癌組織和鄰近正常組織先以 PBS 清洗, 再用每 100 mg 組織 1 ml PBS 研磨(30 strokes, Konetes homogenizer)
- 2) 研磨液在冰上靜置 10 分鐘之後, 離心 14,000xg 30 mins 分鐘, 取上清液並且放置 -80 °C 備用

3. Zymogram Protease Assays

(A) 檢體中蛋白量的分析(Bio-Rad protein assay solution, Richmond, CA)

- 1) BSA 的 standard curve (單位: μ l)

std No	blank	1	2	3	4	5	6	7	8
BSA (0.4mg/ml)	0	4	8	12	16	20	24	28	32
ddH ₂ O	200	196	192	188	184	180	176	172	168
ddH ₂ O	500								
buffer	100								
dye	200								
std conc.(μ g/ml)	0	1.6	3.2	4.8	6.4	8	9.6	11.2	12.8

2) 測量 sample 蛋白質量

取 100 μ l sample 加入 700 μ l ddH₂O , 200 μ l dye , 混合均勻即可測蛋白質含量 (Bradford protein assay)

(B) SDS-聚丙烯醯氨板膠電泳法

1) 配製 0.1% Gelatin- 8% SDS-PAGE 配製(0.75 mm)

	resolving gel (11 ml)	stacking gel (3.5 ml)
1.5 M Tris-HCl ,pH 8.8	2.75 ml	0
0.5 M Tris-HCl ,pH 6.8	0	0.91 ml
10 % SDS	110 μ l	35 μ l
30 % acrylamide-1.2 % Bisacrylamide	2.96 ml	0.49 ml
APS (10 mg/ml)	0.55 ml	175 μ l
Gelatin (2 %)	0.55 ml	0
dH ₂ O	4.08 ml	1.89 ml
TEMED	7 μ l	8 μ l

- 2) 將已凝固之板膠用固定到電泳裝置上，於電泳槽內注滿緩衝液 (tray buffer)
- 3) 取 20 μ l 檢體 (25 μ g) 加入 5 μ l 5X loading buffer (不含有 β -MSH 或其它 reducing agents)，mix 後取 10 μ l loading 至板膠槽中 (well)
- 4) 進行 electrophoresis 分析：150 伏特 2.5 小時

(C) 電泳後 gel 之處理

- 1) 取出 gel 加入 100 ml Washing buffer (2.5% Triton X-100 in dH₂O) 在室溫洗 30 分鐘 (gyrotory shaker)，再換一次 100 ml Washing buffer 30 分鐘
- 2) 倒掉 Washing buffer，gel 先以 dH₂O rinse 再加入 200 ml Reaction buffer (40 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM CaCl₂, 0.01% NaN₃)，於 37 °C 恆溫箱中震盪反應 12 小時以上
- 3) 反應後取出 gel 以 0.25 % Coomassie brilliant blue R-250 染色液 1 小時，再用退色液退色

Tary buffer 配製：3 g Tris-base，14.7 g glycine，10 ml 10% SDS 再加水至 1,000 ml

染色液配製：227 ml dH₂O，46 ml acetic acid，1.25 g Coomassie brilliant blue R-250，mix 直到染色液全部溶解再加入 227 ml methanol

退色液配製：875 ml dH₂O，50 ml methanol，75 ml acetic acid

4.FPLC 分子篩濾層析法(FPLC Gel filtration chromatography)

- 1) 將 Superdex HR-200(10 x 300 mm , 25 ml)分子篩濾層析管柱安裝 FPLC 裝置上，以兩倍管柱體積 PBS 平衡，流速為 0.4 ml/min
- 2) 取 100 μ l 檢體研磨液(細胞質)部份以微量針筒注射入 HPLC 系統，每分鐘收集 1 管收集 40 分鐘，再進行 Zymogram 的分析

5.組織學和臨床上的檢視

6.統計學上的分析(Statistical analysis)

7.Optimal pH 的測定

- 1) 配製 0.1% Gelatin- 8% SDS-PAGE 配製(0.75 mm thick , Bio-Rad Mini-Protean II)
- 2) 將每個 well loading 10 μ g 相同的檢體，進行 electrophoresis 分析：120 伏特, 1 小時
- 3) 經過電泳之凝膠，每個 Lane 切成大小一致的條狀後加入 50 ml Washing buffer (2.5% Triton X-100 , 40 μ l 1N HCl)，在室溫下洗 30 分鐘後，再換一次 50 ml Washing buffer 洗 30 分鐘
- 4) 將每個條狀凝膠分別加入各種不同 pH 值的緩衝溶液(內含 10 mM CaCl₂ 和 0.01% NaN₃)中，再在 37 °C 下反應 12 小時，反應之後染色和退色方法及步驟同前述

各種不同的 pH 值之配製

pH 值	緩衝溶液	緩衝溶液用量 (final 40 mM) + dH ₂ O	
4	0.2 M NaoAc 9 ml + 0.2 M HoAc 41 ml	1 ml	4 ml
5	0.2M NaoAc 17.5 ml + 0.2 M HoAc 7.5 ml	1 ml	4 ml
6	0.1M Citric acid 5.75 ml + 0.1M Trisodium citrate dihydrate 44.25 ml	2 ml	3 ml
7	1 M Tris-HCl pH 7.6 5 ml + HCl + dH ₂ O to 50 ml	2 ml	3 ml
8	4 M Tris-HCl pH 8 1.25 ml + HCl + dH ₂ O to 50 ml	2 ml	3 ml
9	0.2M glycine 12.5 ml + 0.2 M NaOH 2.2 ml + 35.3 ml dH ₂ O	4 ml	1 ml
10	0.2M glycine 12.5 ml + 0.2 M NaOH 8 ml + 29.5 ml dH ₂ O	4 ml	1 ml

8. 蛋白酶抑制劑抑制蛋白酶活性分析

- 1) 配製 0.1% Gelatin- 8% SDS-PAGE 配製(0.75 mm ,Bio-Rad Mini-Protean II)
- 2) 進行 electrophoresis 分析 → 50 ml Washing buffer (40 μl 1N HCl), 同 Optimal pH 測定
- 3) 將每個條狀凝膠分別加入 5 ml 緩衝液(內含 40 mM Tris-HCl, pH 8.0; 10 mM CaCl₂, 0.01% NaN₃ 以及各種不同的蛋白酶抑制劑), 置於冰上 10 分鐘
- 4) 室溫下反應 20 小時之後, 反應後染色和退色方法及步驟同前述

蛋白酶抑制劑之配製

stock conc.	100 mM	54 mM	57 mM	0.45 M	100 mM	2 mg/ml	2 mg/ml	0
inhibitor	PMSF	TLCK	TPCK	EDTA	DFP	DLTI	ALTI	Contol
working conc.	5mM	4 mM	4 mM	20 mM	5 mM	174.8 μg/ml	174.8 μg/ml	o
取的μl 量	250	370	351	222	250	437	437	o

PMSF : 溶於 isopropanol (屬於 Serine proteinase inhibitor)

TLCK : 溶於 dH₂O (為 Trypsin inhibitor)

TPCK : 溶於 95%酒精(為 Chymotrypsin inhibitor)

DFP : 溶於 isopropanol (屬於 Serine protease inhibitor)

DLTI : 溶於 dH₂O (屬於 BBI)

ALTI : 溶於 dH₂O(屬於 Kuntiz-type)

9.EDTA 對 Zymography Analysis 之影響

- 1) 配製 0.1% Gelatin- 8% SDS-PAGE 配製(0.75 mm , Bio-Rad Mini-Protean II)
- 2) 進行 electrophoresis 分析→ 50 ml Washing buffer (40 μl 1N HCl) , 同 Optimal pH 測定
- 3) 將每個條狀凝膠分別加入 5 ml 緩衝液(內含 40 mM Tris-HCl, pH 8. , 0.01% NaN₃ 以及各種不同濃度的 EDTA)
- 4) 37 °C 下反應 12 小時之後, 反應後染色和退色方法及步驟同前述

配製含各種不同濃度 EDTA 的緩衝液

EDTA 最後濃度 (mM)	0.45 M EDTA 用量 (μ l)	Tris-HCl, pH8.0 NaN ₃	CaCl ₂	dH ₂ O
0	0		10 mM	
0	0		0	
0.5	5.6		0	加
2	22.3	40 mM Tris- HCl	0	dH ₂ O
4	44.5	, pH8.0	0	至 5 ml
8	88.9	0.01% NaN ₃	0	
10	111.2		0	
20	222.3		0	

10. 不同 Ca²⁺濃度對 Zymography Analysis 之影響

作法同 EDTA 的抑制 Zymography Analysis 分析，只是緩衝液的配製不同

配製含各種不同 Ca²⁺濃度的緩衝液

CaCl ₂ 最後濃度 (mM)	1 M CaCl ₂ 的用量 (μ l)	Tris-HCl, pH8.0 NaN ₃	dH ₂ O
0	0		
0.5	2.5		
2	10	40 mM Tris-HCl	加
4	20	, pH8.0	dH ₂ O
8	40	0.01% NaN ₃	至 5 ml
10	50		
20	100		
40	200		

11. 不同二價離子對 Zymography Analysis 之影響

作法同 EDTA 的抑制 Zymography Analysis 分析，只是緩衝液的配製不同

配製含各種不同二價離子的緩衝液

	提供之離子	離子的最後濃度	Tris-HCl, pH8.0 NaN ₃	dH ₂ O
Control	0	0	40 mM Tris-HCl , pH8.0 0.01% NaN ₃	加 dH ₂ O 至 5 ml
CaCl ₂	Ca ²⁺	0.5 mM		
ZnCl ₂	Zn ²⁺			
CuCl ₂	Cu ²⁺			
MgCl ₂	Mg ²⁺			
CdCl ₂	Cd ²⁺			
MnCl ₂	Mn ²⁺			

12. Ca²⁺ 存在下不同濃度 Zn²⁺ 對 Zymography Analysis 之影響

作法同 EDTA 的抑制 Zymography Analysis 分析，只是緩衝液的配製不同

配製含各種不同 Zn²⁺ 濃度的緩衝液

Zn ²⁺ 最後濃度 (mM)	50 mM Zn ²⁺ 的用量 (μ l)	CaCl ₂ (mM)	Tris-HCl, pH8.0 NaN ₃	dH ₂ O
0	0	10		
0	0	0		
0	0	0.5	40 mM	加
0.2	20	0.5	Tris-HCl	
0.4	40	0.5	, pH8.0	dH ₂ O
0.6	60	0.5	0.01% NaN ₃	
0.8	80	0.5		至 5
1	100	0.5		ml

13. 各種不同的蛋白酶對 Zymography Analysis 之影響

1) 配製 0.1% Gelatin- 8% SDS-PAGE 配製(0.75 mm , Bio-Rad Mini-Protean II)

2) 各種蛋白酶的配製

	stock 濃度	稀釋後濃度	加入檢體的量
Trypsin	5 mg/ml , 1 mM HCl	5 ng/ μ l	5 μ l
Chymotrypsin			
Nargase	1 mg/ml , 1 mM HCl	5 ng/ μ l	
Thermolysin			
Proteinase K	1 mg/ml , 1 mM HCl	2.5 ng/ μ l	

3) 檢體之處理

Emzyme	Control		Trypsin			Chymotrypsin			Nargase			Thermolysin			Proteinas K		
檢體類別	N	C	N	C	E	N	C	E	N	C	E	N	C	E	N	C	E
PBS μ l	0		0		15	0		15	0		15	0		15	0		15
檢體體積 μ l (25 μ g)	20		15		0	15		0	15		0	15		0	15		0
Enzyme 的用量 (25ng)	0		5 μ l														
處理時間	37 $^{\circ}$ C 30 mins																
5X loading buffer	5 μ l																
全部體積	25 μ l																
Apply 體積	10 μ l																

4) 進行 electrophoresis 分析：150 伏特，2.5 小時

5) 電泳後凝膠之處理同 Zymogram Protease Assays，(pp15)

14. 以 Trypsin 活化組織研磨液之 Zymography Analysis 分析

1) 取 15 μ l 檢體(25 μ g)加入 5 μ l 5 mg/ml Trypsin，mix 後在 37 $^{\circ}$ C 下反應 30 分鐘

2) 加入 5 μ l 5X loading buffer (不含有 β -MSH 或其它 reducing agents)，mix 後取 10 μ l loading 至已凝固之板膠 well 中

3) 進行 electrophoresis 分析：150 伏特 for 2.5 小時

4) 電泳後凝膠之處理同 Zymogram Protease Assays，(pp15)

實驗結果

一、38 個乳癌病人的乳癌組織和乳癌組織鄰邊的正常組織中 gelatinase 的表現

以 Zymography 電泳分析 38 個乳癌病人，結果顯示主要出現 92、72、62 kd gelatinase，而以 72 kd gelatinase 不論乳癌組織(T)或正常組織(N)都有出現活性，然而 62 kd gelatinase 只專一性的出現在乳癌組織中，至於 92 kd gelatinase 大部分都有出現，其特異性不似 62、72 kd gelatinase 那麼明顯，但有趣的是在 92 kd gelatinase 附近，正常組織有較高的 band，而在乳癌組織中則出現較低的 band。(圖一)

二、乳癌組織中表現的 62 kd gelatinase 活性與病人病理資料的比較

Table 1 是依 62 kd gelatinase 的活性值由高到低排列，我們將 37 個病人分成三群，依 62 kd gelatinase 的活性值在 $200 \text{ INT} \times \text{mm}^2$ 以上為 group 1，有 10 個病人其中有 6 個淋巴結轉移；活性值在 $200-100 \text{ INT} \times \text{mm}^2$ 之間為 group 2，有 12 個病人其中有 7 個淋巴結轉移；而活性值在 $100 \text{ INT} \times \text{mm}^2$ 以下為 group 3，有 15 個病人其中有 3 個淋巴結轉移。因此 62 kd gelatinase 的活性值在 $100 \text{ INT} \times \text{mm}^2$ 以上(group 1 + group 2)有明顯轉移的情形。

三、比較三個 group 中的 MMP-2

在 table 2 中可知，72 kd gelatinase 的活性在正常組織和乳癌組織中的表現沒有什麼差別，但 62 kd gelatinase 的活性在乳癌組織中的表現明顯高於在正常組織中。由於先前的研究已知，72、62 kd gelatinase 分別為 MMP-2 的不活化態和活化態。因此藉由 MMP-2 的

活化態 rate (62 / 72 + 62 kd gelatinase)值發現，在 group 1 中是最高而在 group 3 中則是最低；同時 MMP-2 (72 + 62 kd gelatinase)的表現量也是 group 1 最高而 group 3 最低。因此 62 kd gelatinase 的活性和 MMP-2 的表現量越高，轉移就越多。

四、比較 MMP-2 活化態 rate 和表現量與臨床上的指標之關連性

a. 淋巴結的轉移

62 kd gelatinase 的活性在有淋巴結轉移比在無淋巴結轉移中高出 2 倍，而 62 + 72 kd gelatinase 的表現量也是超過 2 倍。

b. 乳癌的級數

第 III 級的 62 kd gelatinase 活性是第 II 級的 2 倍、第 I 級的 4 倍；第 III 級的 62 + 72 kd gelatinase 的表現量是第 II、I 級的 2 倍。

c. Estrogen receptor

62 kd gelatinase 在 negative estrogen receptor 比在 positive 高出 1.5 倍。

由此可知，62 kd gelatinase 的活性隨著乳癌級數越高、negative estrogen receptor 和有淋巴結轉移而越高。

五、分析 62、72 kd gelatinase 在細胞內存在的形式

利用 FPLC 將 62、72 kd gelatinase 以其在細胞內的 nature form 分離。在正常組織中主要表現的為 72 kd gelatinase 活性，其出現在 28-31 管中，但主要是在第 29 管中，因為 1 分鐘收集 1 管也就是說 72 kd gelatinase 主要是出現在第 29 分鐘，以此比照標準分子量曲線圖(A 圖)，可以推算分子量約為 174 kd，進而推測 72 kd gelatinase 可能是以 homodimer form 存在(B 圖)。然而在乳癌組織中 62、72 kd gelatinase 同時出現在第 28-32 分鐘內，但主要是在第 30 分鐘內，推算分子量

約為 134 kd，因此在乳癌組織中可能是以 heterodimer form(62 + 72 kd gelatinase)存在(C 圖)。(圖二)

六、乳癌中 62、72 kd gelatinase Optimal pH 值的測定

爲了了解 62、72 kd gelatinase 在何種 pH 值下會有最大的活性值，因此利用各種不同 pH 值的緩衝液做反應。結果得知，正常組織中的 72 kd gelatinase 的活性出現在 pH 7-8 中，以 pH 8 活性最大。同樣的，在乳癌組織中 62、72 kd gelatinase 的活性也出現在 pH 7-8 中，也以 pH 8 活性最大。(圖三)

七、蛋白酶抑制劑抑制乳癌中之 62、72 kd gelatinase 活性的分析

藉由各種蛋白酶抑制劑的抑制效果，可以了解 62、72 kd gelatinase 是屬於那一類的蛋白酶。正常組織中的 72 kd gelatinase 在加入蛋白酶抑制劑後，活性都普遍下降，但以 EDTA 幾乎完全抑制活性，可知其爲 metalloproteinase。而在乳癌組織中的 62、72 kd gelatinase 則會受到 TPCK 抑制約 50% 的活性，但仍以 EDTA 幾乎完全抑制活性，故其爲 metalloproteinase。(圖四)

八、EDTA 抑制乳癌中之 62、72 kd gelatinase 活性分析

由蛋白酶抑制劑抑制乳癌中之 62、72 kd gelatinase 活性分析(圖四)，知道 62、72 kd gelatinase 皆爲 metalloproteinase，故需要二價陽離子當 cofactor 才會有活性，因此爲了探討何種二價陽離子可作爲這些 gelatinase 的 cofactor，所以需要先了解在何種濃度之下，EDTA 可以將研磨液本身存有的二價陽離子抓完，以便一加二價陽離子就可恢復 gelatinase 的活性，進而知道該二價陽離子可以作爲 gelatinase 的

cofactor。結果顯示只要反應液中無任何 Ca^{2+} ，這些 gelatinase 就無活性。(圖五)

九、不同 Ca^{2+} 濃度對乳癌中之 72、62 kd gelatinase 活性的影響分析

在圖五中得知只要無 Ca^{2+} 存在，72、62 kd gelatinase 就無活性，因此 72、62 kd 為 Ca^{2+} -dependent 的 gelatinase，故欲進一步了解 Ca^{2+} 恢復 72、62 kd gelatinase 活性的能力。結果在 0.5 mM Ca^{2+} 存在下，就可以恢復 72、62 kd gelatinase 的活性。在正常組織中的 72 kd gelatinase 在 Ca^{2+} 0.5 mM 時就已有最大活性，但隨著 Ca^{2+} 濃度上升活性反而下降。然而乳癌組織中的 72、62 kd gelatinase 在 Ca^{2+} 4 mM 時有最大的活性，但是在 Ca^{2+} 8 mM 時活性下降，其中 72 kd gelatinase 在 Ca^{2+} 10、20 mM 時活性呈上升狀態但到了 40 mM 時又下降；而 62 kd gelatinase 在 Ca^{2+} 10 mM 時活性上升，但後來的 20、40 mM 時又呈現下降趨勢。(圖六)

十、不同二價離子(0.5 mM)對乳癌中的 72、62 kd gelatinase 的影響

由圖四得知正常組織和乳癌組織中的 72、62 kd gelatinase 是屬於 metalloprotease，需要二價離子當 cofactor 才會有活性，而且不同的二價離子代表不同的生理作用，比如 Zn^{2+} 是和增殖有關、 Ca^{2+} 是和細胞內訊號傳遞有關，所以可以利用 cofactor 間接指出此蛋白酶的生理功能為何。因此欲進一步探討何種二價離子可當 72、62 kd 蛋白酶的 cofactor。結果顯示只有 Ca^{2+} 能夠活化這些 gelatinases。(圖七)

十一、在 Ca^{2+} 存在下，不同濃度的 Zn^{2+} 對於乳癌中之 72、62 kd gelatinase 活性之影響分析

由於先前的報告指出 MMP-2 的 domain 上有 Zn^{2+} 的 binding

site，然而在圖七的實驗中 Zn^{2+} 不能恢復 gelatinases 的活性，但是在另一份研究中指出在 Ca^{2+} 以及少量的 Zn^{2+} 存在下，gelatinase 具有活性。故藉由 Zn^{2+} 濃度變化來了解 Zn^{2+} 對 72、62 kd gelatinase 活性的影響。由圖八知道：少量的 Zn^{2+} 存在下對於正常組織和乳癌組織中的 62、72 kd gelatinase 活性有抑制的效果，可能是 Zn^{2+} 對於 gelatinase 的 binding 能力較 Ca^{2+} 強，而將 Ca^{2+} 競爭下來而使 72 kd gelatinase 喪失活性。

十二、不同的蛋白酶活化乳癌(正常組織和乳癌組織)研磨液的分析

已知有許多的蛋白酶以及 MMP family 的成員分別是以 proproteinase form 和 zymogen form 存在細胞質中，需要其它的蛋白酶將其作進一步的切割，才會具有活性。因此利用各種不同的蛋白酶處理正常組織和乳癌組織，檢視是否會對 62、72 kd gelatinase 造成影響或誘發新的其它蛋白酶。結果 Trypsin 在正常組織和乳癌組織中會誘發三條新的 gelatinases，分別在 72 kd gelatinase 的上面；72 和 62 kd gelatinase 的中間以及 62 kd gelatinase 的下面。用 Chymotrypsin、Nargase 處理沒有什麼改變。Proteinase K 可能會將 62、72 kd gelatinase 分解，因為這二個 gelatinases 的 band 消失了。Thermolysin 似乎會將 72 kd gelatinase 切成 62 kd gelatinase，因 72 kd gelatinase 的 band 變得較淡而 62 kd gelatinase 的 band 變得較亮(圖九)。APMA 也會誘發一條新的 gelatinase，在 72 和 62 kd gelatinase 的中間。(圖十)

討 論

利用 zymography 的方法，測定人類乳癌中 latent form 的 92 kd gelatinase 和 active form 的 72 kd gelatinase。結果顯示 92 kd gelatinase 在外科手術取得的人類乳癌組織中的活性高於相同病人之乳癌組織鄰近的正常組織。而同時 72 kd gelatinase 的活化態 62 kd gelatinase 主要表現在乳癌組織中，而且 62 kd gelatinase 表現的程度和病理上發生淋巴結轉移有關。而相對於乳癌組織的鄰近正常組織中 62 kd gelatinase 的表現量很低，因此 62 kd gelatinase 的表現量可作為有用的乳癌之臨床指標(圖一、Table 3)。

雖然我們不能清楚的區分，用 PBS buffer 萃取細胞質中的 62 kd gelatinase 和用 SDS 萃取全部細胞中的 62 kd gelatinase，對於 62 kd gelatinase 的活性表現有何不同，但有一點是清楚的，就是在腫瘤組織中，62 kd gelatinase 的活性幾乎都是表現在細胞質中。因此我們針對 62 和 72 kd gelatinase 做一些性質上的探討，並且研究在鄰近的正常組織中的 72 kd gelatinase 和在乳癌組織中出現的 62 和 72 kd gelatinase 之間的關係。結果發現，不管是鄰近的正常組織中的 72 kd gelatinase 還是乳癌組織中的 62 和 72 kd gelatinase，其 optimal pH 為 8，且活性出現的範圍也相同(圖三)。同樣的也皆可被 EDTA 所抑制，是為 metalloproteinase 而且是 MMP-2，同時也是 Ca^{2+} -dependent (圖七)。但是對於 Ca^{2+} 的需求程度有一點不同，鄰近的正常組織中的 72 kd gelatinase 只需 0.5 mM Ca^{2+} 就有最大活性，而乳癌組織中的 62 和 72 kd gelatinase 卻需要 4 mM Ca^{2+} 才可達最大活性。這可能是乳癌組織內的 62 和 72 kd gelatinase 較多故需要較多的 Ca^{2+} ，所以比較可能需要定量，在同等的 gelatinase 量下比較 normal 與 cancer 之差異(圖六)。

先前有報告指出 MMP-2 上有 Zn^{2+} binding domain，且 Zn^{2+} 可以參與 MMP-2 分解蛋白的反應，但是在我們的實驗中， Zn^{2+} 不但不能使 62 和 72 kd gelatinase 恢復活性，甚至可以抑制原本經由 Ca^{2+} 恢復的活性。這可能是 62 和 72 kd gelatinase 為 Ca^{2+} -dependent，而 Zn^{2+} 對這兩個 gelatinases 的 binding affinity 比 Ca^{2+} 好，所以 Zn^{2+} 結合上 gelatinases 使 gelatinases 因缺少 Ca^{2+} 而失去活性(圖八)。因此基本上，在鄰近的正常組織的 72 kd gelatinase 和乳癌組織中的 72 kd gelatinase 是性質相同。

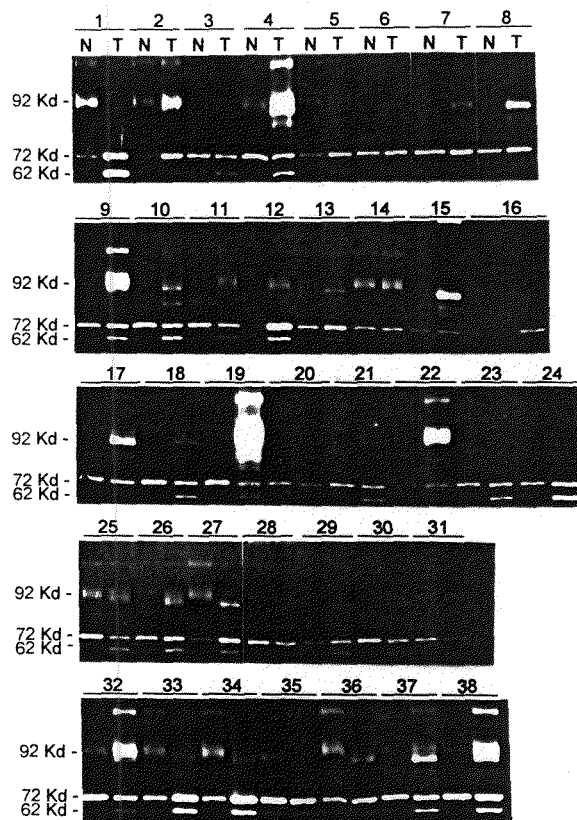
MMP-2 是一種分泌性蛋白，但是對於 MMP-2 發生活化過程的位置尚不清楚。最近有許多學者利用 immunohistochemical 的方法，得知增加的 MMP-2 主要出現在腫瘤細胞的 cytoplasm。而在 *in vitro* 的研究中，利用 Con A 處理人類具侵襲能力的乳癌細胞株，結果發現 Con A 可以在細胞膜的表面活化 MMP-2。雖然至目前為止，尚不能清楚解釋 MMP-2 被活化的結果會是如何，即使能證明 MMP-2 的活化和腫瘤轉移的潛能有關，但也只是在具侵襲能力的人類乳癌細胞株中得到證明。然而在最近的研究中也指出，細胞質中的酵素和 62 kd gelatinase 活性的表現以及發生淋巴結轉移有關。這個酵素可能在活躍腫瘤組織中被活化，如 Thermolysin (一種細菌的內生性酵素)可能將 72 kd gelatinase 切成 62 kd gelatinase (圖九)。這個現象可以用來解釋，在腫瘤組織中已活化的 62 kd gelatinase 存在於細胞質。在這種具有活躍腫瘤的腫瘤組織中，MMP-2 可能是由 transformed cells 合成的活化劑所活化，然後再送入腫瘤的 cytoplasm 中。

而 62 和 72 kd gelatinase 皆是以 dimer 的形式存在，因為在 FPLC 的實驗中，鄰近的正常組織和乳癌組織中所表現的 62 和 72 kd gelatinase 在不同的 fractions 中出現，因此我們推測，在乳癌組織中的

gelatinase 應該是以三種不同形式的 dimer 存在, 主要是 heterodimer(62 + 72 kd), 以及二種 homodimer(72 kd 或 62 kd)(圖二), 但是從實驗結果無法知道在 tumor progression 中是以何種 dimer 為主。然而不管如何, 62 kd gelatinase 的活性值在 100 INT x mm² 以上就有明顯轉移的情形(Table 1), 再者藉由觀察 62 kd gelatinase 的活性與臨床上的病理指標之關係, 可知結果雖然沒有顯著差異, 但 62 kd gelatinase 的活性隨著乳癌級數越高或為 negative estrogen receptor 或是有淋巴結轉移而越高。因此我們認為 62 kd gelatinase 活性的增加確實和乳癌惡化過程可能有關連。

所以了解 MMP-2 尤其是細胞質的 62 kd gelatinase, 在乳癌組織內所扮演的角色, 可能有助於了解乳癌形成機制。而最後這些結果將可以提供乳癌病情診斷和治療的方向, 並期望國內乳癌患者病情得到適當的治療和控制, 而使因乳癌而死亡的機率逐漸減少。

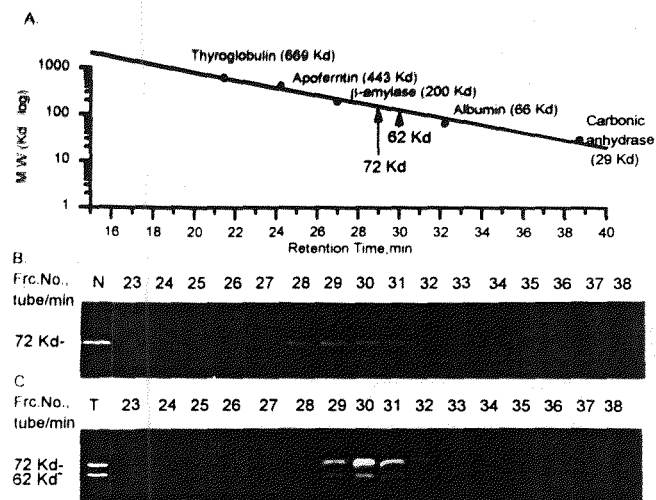
圖表與圖表說明



圖一、比較 38 個乳癌病人的乳癌組織和正常組織中的蛋白脢

N : 正常組織 (乳癌組織鄰邊的正常組織)

C : 乳癌組織



圖二、FPLC 分子篩濾層析法

分析乳癌中 72、62 kd 蛋白酶在細胞內存在的形式

A 圖：標準分子量曲線圖

B 圖：正常組織研磨液直接通入 FPLC 中，以 PBS 為沖提液，每分鐘收集一管(400 μ l)，再取第 23 到 38 管 40 μ l 進行 Zymogram 分析

N：未通入 FPLC 的正常組織研磨液(10 μ g)

C 圖：乳癌組織研磨液直接通入 FPLC 中，條件同上，也是取第 23 到 38 管 40 μ l 進行 Zymogram 分析

T：未通入 FPLC 的乳癌組織研磨液(10 μ g)

Table 1. Expression of 62-kd (INT x mm²) gelatinase in human breast cancer *

Group	Sample	62-kd	LNM	Tumor			Histology
				grade	ER	PR	
1 §	1	1126	+	III	-	-	IDC
	4	387	+	III	-	-	Sarcoma
	10	318	+	II	+	ND	IDC
	12	354	-	III	+	ND	IDC
	21	214	-	II	-	ND	IDC
	23	398	-	III	+	ND	IDC
	24	870	+	II	ND	ND	IDC
	33	756	-	III	+	ND	IDC
	34	828	-	III	+	ND	IDC
	37	360	+	III	-	-	IDC
	38	702	+	II	-	-	IDC
2 §	36	139	+	II	+	+	IDC
	3	148	-	II	ND	ND	IDC
	5	101	+	III	+	+	IDC
	9	188	-	I	-	-	IDC
	18	170	-	III	-	-	IDC
	19	109	-	II	ND	ND	IDC
	25	119	+	II	+	ND	IDC
	26	128	+	II	-	-	IDC
	27	100	+	II	+	ND	IDC
	29	117	-	II	-	-	IDC
	30	112	+	II	+	ND	IDC
	35	158	+	III	-	ND	IDC
3 £	2	37	+	II	+	+	IDC
	6	62	+	III	-	-	IDC
	7	66	-	II	-	-	MC
	8	54	-	I	+	ND	IDC
	11	78	-	II	-	-	IDC
	13	95	+	II	+	+	IDC
	14	98	-	II	+	ND	IDC
	15	78	-	II	-	-	IDC

Table 1. (continued)

Group	Sample	62-kd	Tumor			Histology	
			LN ^M	Grade	ER		
	16	43	-	II	+	-	IDC
	17	55	-	III	+	+	IDC
	20	44	-	I	+	ND	IDC
	22	60	-	II	+	ND	IDC
	28	67	-	II	+	ND	IDC
	31	54	-	II	-	ND	MC
	32	92	-	III	+	ND	IDC

* Staging and histology were determined independently of the zymographic data. Grade I is least differentiated; grade II intermediate; and grade III most differentiated. LN = lymph node metastases; ER = estrogen receptor; PR = progesterone receptor; +, positive; -, negative; ND = non-detect; IDC = infiltrating ductal carcinoma; MC = medullary carcinoma. The level of 10 fmol receptor/mg or greater is considered clinically positive for both estrogen receptor and progesterone receptor.

§ Group 1 showed a strong increase in 62-kd gelatinase activity with data more than 200 INT x mm² in cancer tissue. No. 33 and 34 were extracted from the same patient, while No. 34 was the relapse one. Proportion of samples with no indication of lymph node metastases: 4/10.

§ Group 2 showed a slight increase in 62-kd gelatinase activity with data between 100 and 200 INT x mm² in cancer tissue. Proportion of samples with no indication of lymph node metastases: 5/12.

£ Group 3 showed a little amount in 62-kd gelatinase activity with data less than 100 INT x mm² in cancer tissue. Proportion of samples with no indication of lymph node metastases: 12/15.

Table 2. Comparison of rate and activity (INT x mm²) of MMP-2 in defined groups

Group	Normal		Cancer			
	72 kd	62 kd	72 kd	62 kd	72+62 kd	62/72+62 kd
1 (n=10)	602 ± 136	5 ± 5	921 ± 167	556 ± 96**	1478 ± 225	0.39 ± 0.04
2 (n=12)	530 ± 123	7 ± 7	502 ± 106	132 ± 8**	634 ± 108	0.26 ± 0.03
3 (n=15)	360 ± 78	5 ± 4	413 ± 66	66 ± 5**	478 ± 69	0.18 ± 0.02
1-2 (n=22)	563 ± 89	6 ± 4	692 ± 104 [†]	325 ± 63** [†]	1016 ± 147 [†]	0.23 ± 0.03 [†]

** Comparison between normal and cancer, $p < 0.001$.

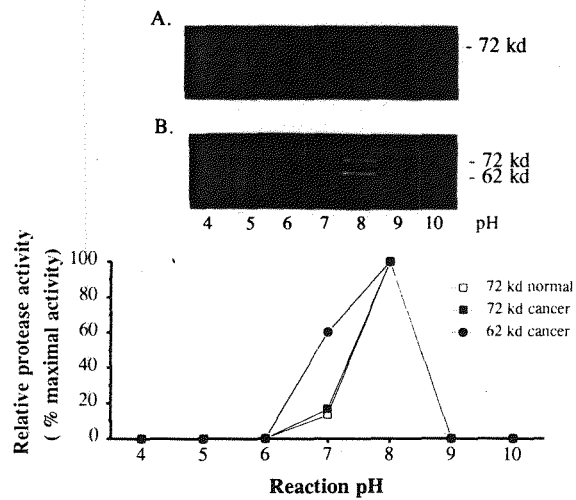
[†] Comparison: Group 3 vs Group 1-2, $p < 0.05$.

Table 3. Comparison of activity (INT x mm²) and activation rate of MMP-2 based on clinical parameters

Group	Normal		Cancer			
	72 kd	62 kd	72 kd	62 kd	72+62 kd	62/72+62 kd
Lymph node						
Negative (n=21)	394 ± 63	0	472 ± 95	158 ± 40**	629 ± 128	0.25 ± 0.02
Positive (n=16)	594 ± 117	13 ± 7	719 ± 98	301 ± 81**	1020 ± 148	0.27 ± 0.04
grade						
I (n=3)	308 ± 69	0	456 ± 183	95 ± 46**	551 ± 193	0.20 ± 0.07
II (n=22)	417 ± 69	5 ± 4	442 ± 75	171 ± 45**	612 ± 105	0.27 ± 0.03
III (n=12)	642 ± 143	7 ± 7	861 ± 135 [†]	341 ± 95**	1201 ± 201 [†]	0.25 ± 0.04
Estrogen receptor						
Negative (n=15)	602 ± 122	9 ± 6	617 ± 111	259 ± 76**	876 ± 167	0.28 ± 0.03
Positive (n=19)	382 ± 73	4 ± 4	579 ± 106	164 ± 44**	742 ± 140	0.22 ± 0.03

** Comparison between normal and cancer, $p < 0.001$.

[†] Comparison: grade II vs grade III, $p < 0.01$

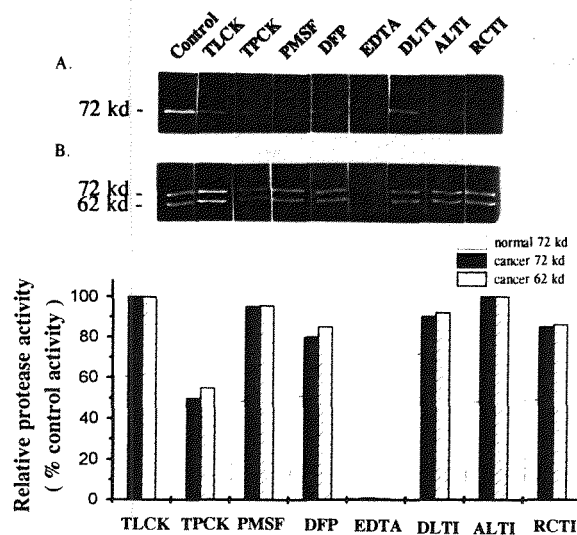


圖三、乳癌中的蛋白酶之 Optimal pH 值的測定

利用各種不同 pH 值的緩衝液，分析 72、62 kd 蛋白酶活性的 pH 值範圍

A 圖：正常組織電泳的結果；B 圖：乳癌組織電泳的結果

C 圖：將電泳的結果利用 AlphaImager 2000 測每個蛋白酶的活性值。計算的方式以 72 kd 蛋白酶為例：取其中最高的活性值當作 100%，而剩下的不同 pH 值的活性值再與之計算相對的百分比，如：不同 pH 值的活性值/最高的活性值 X 100%

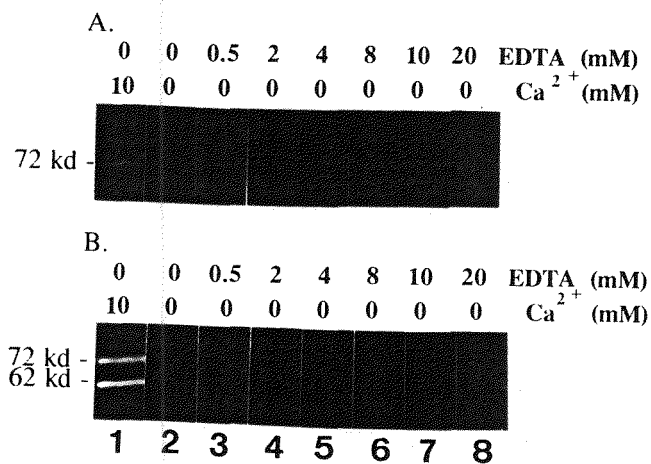


圖四、蛋白酶抑制劑抑制乳癌中之 72、62 kd 蛋白酶活性的分析

可以了解 72、62 kd 蛋白酶是屬於那一類蛋白酶。乳癌組織和正常組織之研磨液先分別 run gel 後，再分別加入不同的蛋白酶抑制反應

A 圖：正常組織電泳的結果； B 圖：乳癌組織電泳的結果

C 圖：電泳的結果利用 AlphaImager 2000 測定每個蛋白酶被抑制後的活性值。計算的方式以正常組織之 72 kd 蛋白酶為例：以正常組織的 Control 之 72 kd 蛋白酶活性值為 100%，如：TLCK 抑制後的正常組織之 72 kd 蛋白酶活性值/正常組織的 Control 之 72 kd 蛋白酶活性值 X 100%



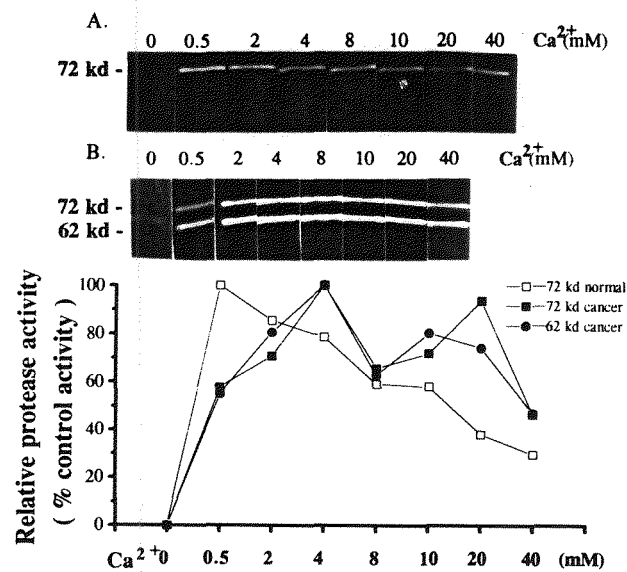
圖五、EDTA 抑制乳癌中之 72、62 kd 蛋白酶活性的分析

由蛋白酶抑制劑抑制乳癌中之 72、62 kd 蛋白酶活性的分析，得知 72、62 kd 蛋白酶受 EDTA 所抑制，故兩者屬於 metalloprotease。因此欲進一步了解，EDTA 在何種濃度之下就可以達到抑制的效果

Lane 1：當 control 組（一般蛋白酶特徵研究的條件）

Lane 2、3、4、5、6、7、8：當實驗組

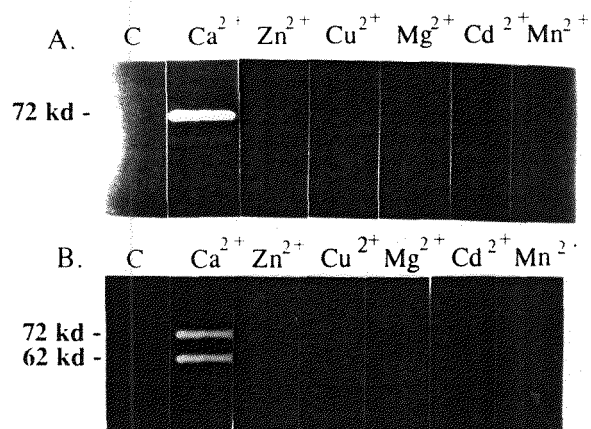
A 圖：正常組織電泳的結果； B 圖：乳癌組織電泳的結果



圖六、不同 Ca^{2+} 濃度對乳癌中之 72、62 kD 蛋白酶活性的影響分析
 在圖五中可知只要無 Ca^{2+} 存在，72、62 kD 蛋白酶就無活性，由於
 72、62 kD 為 Ca^{2+} -dependent 蛋白酶，因此欲進一步了解 Ca^{2+} 恢復
 72、62 kD 蛋白酶活性的能力

A 圖：正常組織電泳結果； B 圖：乳癌組織電泳結果

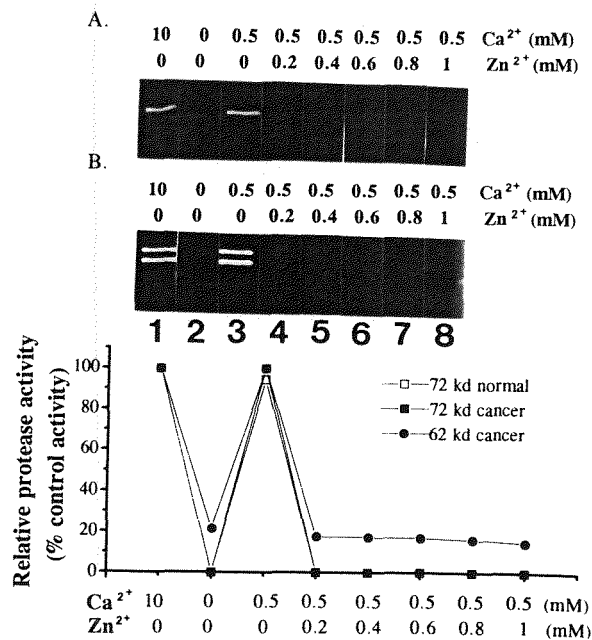
C 圖：為電泳結果的曲線圖。將電泳的結果以 AlphaImager 2000 測
 72、62 kD 蛋白酶的活性值，。計算的方式以正常組織的 72 kD 蛋白
 酶為例：以最高的正常組織之 72 kD 蛋白酶活性值為 100%，如：其
 餘正常組織的 72 kD 蛋白酶活性值 / 最高的正常組織之 72 kD 蛋白酶
 活性值 X 100



圖七、不同二價離子(0.5 mM)對乳癌中的 72、62 kd 蛋白酶的影響
 由圖四得知正常組織和乳癌組織中的 72、62 kd 蛋白酶是屬於 metalloprotease，需要二價離子當 cofactor 才會有活性，因此欲進一步探討何種二價離子可當 72、62 kd 蛋白酶的 cofactor

A 圖：正常組織電泳結果； B 圖：乳癌組織電泳結果

C：不加任何二價離子，當作 control 組



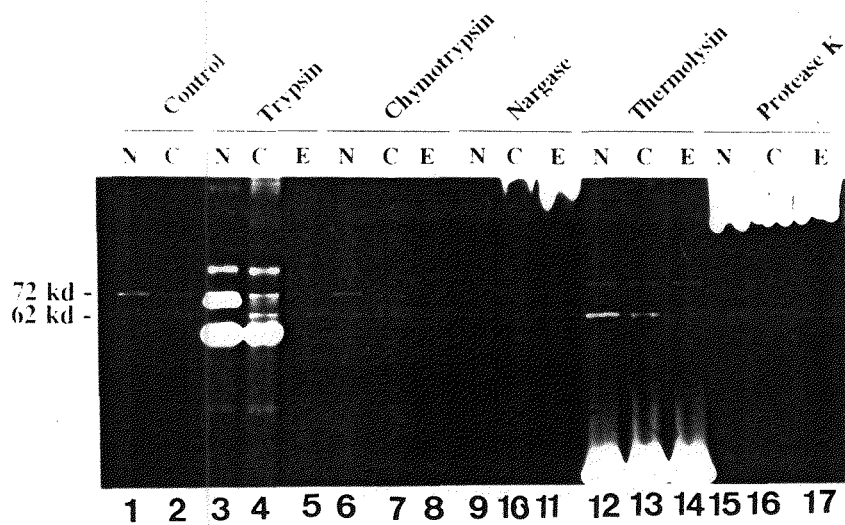
圖八、在 Ca²⁺ 存在下，不同濃度的 Zn²⁺ 對於乳癌中之 72、62 kd 蛋白酶活性之影響分析

由圖五中可知只要無 Ca²⁺ 存在，72、62 kd 蛋白酶就無活性，而先前的報告指出 MMP-2 的 domain 上有 Zn²⁺ 的 binding site。故藉由 Zn²⁺ 濃度變化來了解 Zn²⁺ 對 72、62 kd 蛋白酶活性的影響。A 圖：正常組織電泳結果；B 圖：乳癌組織電泳結果

Lane 1：當 control 組(一般蛋白酶特徵研究的條件)

Lane 2、3、4、5、6、7、8：當實驗組

C 圖：為電泳結果的曲線圖。將電泳的結果以 AlphaImager 2000 測 72、62 kd 蛋白酶的活性值，。計算的方式以正常組織的 72 kd 蛋白酶為例：以正常組織的 Control 之 72 kd 蛋白酶活性值為 100%，如：
 正常組織的實驗組之 72 kd 蛋白酶活性值 / 正常組織的 Control 之 72 kd 蛋白酶活性值 X 100%



圖九、不同的蛋白酶活化乳癌(正常組織和乳癌組織)研磨液的分析

Lane 1、2：乳癌研磨液未加蛋白酶活化，作為 control 組

Lane 3、4；6、7；9、10；12、13；15、16：

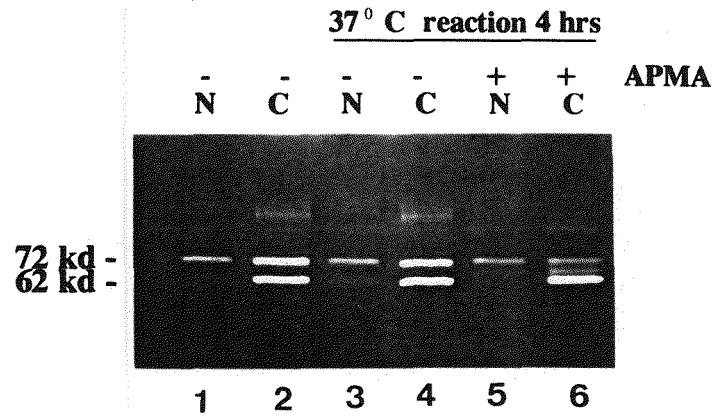
乳癌研磨液分別先加 Trypsin、Chymotrypsin、Nargase、
Thermolysin、Protease K 活化

Lane 5、8、11、14、17：分別只有 Trypsin、Chymotrypsin、
Nargase、Thermolysin、Protease K

N：正常組織

C：乳癌組織

E：蛋白酶



圖十、APMA(25 nM)活化乳癌(正常組織和乳癌組織)研磨液(25 μ g)的分析

Lane 1、2：乳癌研磨液未加 APMA 活化

Lane 3、4：乳癌研磨液未加 APMA 活化，但經過 37 °C incubation 4 個小時

Lane 5、6：乳癌研磨液加 APMA 活化，經過 37 °C incubation 4 個小時

N：正常組織 C：乳癌組織

1. Dano, k., Andreasen, P. A., Grondahl-Hansen, J., Kristensen, P. I., Nielsen, L. S. and Skriver, L. (1985) Plasminogen activators, tissue degradation, and cancer. *Adv. Cancer Res.* 44, 139-266.
2. Alexander, C. M. and Werb, Z. (1991) Extracellular matrix degradation. IN: E.D. Hay (ed): *Cell Biology of Extracellular Matrix*. Second Edition. Plenum Press, New York, pp 255-302.
3. Lola, P. K. and Graham, C. H. (1990) Mechanisms of trophoblast invasiveness and their control: the role of proteases and protease inhibitors. *Cancer Metastasis Rev.* 9, 369-380.
4. Banda, M. J., Herron, G. S., Murphy, G., Werb, Z. and Dwyer, K. S. (1988) Proteinase induction by endothelial cells during wound repair. *Prog Clin. Biol. Res.* 266, 117-130.
5. Tryggvason, K., Hoyhtya, M. and Salo, T. (1987) Proteolytic degradation of extracellular matrix in tumor invasion. *Biochimica. Biophysica. Acta.* 907, 191-217.
6. Kefalides, N. A., Alper, R. and Clark, C. (1979) Biochemistry and metabolism of basement membranes *Int. Rev. Cytol.* 61, 167-228.
7. Vracko, R. (1982) in *New Trends in Basement Membrane Research* (Kuhn, K., Schone, H. and Timpl, R., eds.), pp. 1-8, Raven Press, New York.
8. Hunt, G. (1989) The role of laminin in cancer invasion and metastasis. *Exp. Cell. Biol.* 57(3), 165-176.
9. Kanemoto, T., Reich, R., Royce, L., Greatorex, D., Adler, S. H., Shiraishi, N., Martin, G. R., Yamada, Y. and Kleinman, H. K. (1990) Identification of an amino acid sequence from the laminin A chain that stimulates metastasis and collagenase IV production. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 2279-2283.

10. Monteagudo, C., Merino, M. J., San-Juan, J., Liotta, L. and Stetler-stevenson, W., (1990) Immunohistochemical distribution of type IV collagenase in normal, benign, and malignant breast tissue. *Am. J. Pathol.*, 36, 585-592.
11. Van Der Stappen, J. W., Hendriks, T. and Wobbes, T. (1990) Correlation between collagenolytic activity and grade of histological differentiation in colorectal tumors. *Int. J. Cancer.* 45, 1071-1078.
12. Levy, A. T., Cioce, V., Sobel, M.E., Garbisa, S., Grigioni, W.F. and Liotta, L. A. (1991) Increased expression of the Mr. 72,000 typeIV collagenase in human colonic adenocarcioma. *Cancer Res.* 439-444.
13. Otani, Y. (1990) The collagenase activities, interstitial collagenase and typeIV collagenase, in human stomach cancer: with special reference to local spreading and lymph node metastasis. *Keio. J. Med.* 39, 159-167.
14. D'errico, A., Garbisa, S., Liotta, L. A., Castronovo, V., Stetler-Stevenson, W.G. and Grigioni, W. F. (1991) Augmentation of type IV collagenase, laminin receptor, and Ki67 proliferation antigen associated with human colon, gastric, and breast carcinoma progression. *Mod. Pathol.* 4, 239-246.
15. Goldberg, G. I. et al. (1986) Human fibroblast collagenase. Complete primary structure and homology to an oncogene transformation-induced rat protein. *J. Biol. Chem.* 261, 6600-6605.
16. Macartney, H. W. and Tschesche, H. (1983) Latent and active human polymorphonuclear leukocyte collagenases. Isolation, purification and characterisation. *Eur. J. Biochem.* 130, 71-78.
17. Collier, I.E. et al. (1988) H-ras oncogene-transformed human bronchial epithelial cells (TBE-1) secrete a single metalloproteinase capable of degrading basement membrane collagen. *J. Biol. Chem.* 263, 6579-6587.

18. Wilhelm, S.M. et al. (1989) SV40-transformed human lung fibroblasts secrete a 92- kDa type IV collagenase which is identical to that secreted by normal human macrophages. *J. Biol. Chem.* 264, 17213-17221.
19. Chin, J. R., Murphy, G. and Werb, Z. (1985) Stromelysin, a connective tissue-degrading metalloendopeptidase secreted by stimulated rabbit synovial fibroblasts in parallel with collagenase. Biosynthesis, isolation, characterization, and substrates. *J. Biol. Chem.* 260, 12367-12376.
20. Nicholson, R., Murphy, G. and Breathnach, R. (1989) Human and rat malignant-tumor-associated mRNAs encode stromelysin-like metalloproteinases. *Biochemistry.* 28, 5195-5203.
21. Quantin, B., Murphy, G. and Breathnach, R. (1989) Pump-1 cDNA codes for a protein with characteristics similar to those of classical collagenase family members. *Biochemistry.* 28, 5327-5333.
22. Matrisan, L.M. (1990) Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling. *Trends Genet* 6(4), 121-125.
23. Steller--Stevenson, W. G. (1990) type IV collagenase in tumor invasion and metastasis. *Cancer Metast. Rev.* 9, 289-303.
24. Polette, M., Clavel, C., Cockett, M., Girodde Bentzmann, S. Murphy, G. and Birembaut, P. (1993) Detection and localization of mRNA's encoding matrix metalloproteinase and their tissue inhibitor in human breast pathology. *Invasion & Metastasis.* 13, 31-37.
25. Clavel, C., Polette, M., Doco, M., Binninger, I. and Birembaut, P. (1992) Immunolocalization of matrix metallo-proteinases and their tissue inhibitor in human mammary pathology. *Bull Cancer (Paris),* 79, 261-270.

26. Brown, P. D., Bloxidge, R. E., Anderson, E. and Howell, A. (1993) Expression of activated gelatinase in human invasive breast carcinoma. *Clin. Exptl. Metast.* 11, 183-189.
27. Davies, B., Miles, D. W., Hepperfield, L. C., Naylor, M. S., Bobrow, L. G., Rubens, R. D. and Balkwill, F. R. (1993) Activity of type IV collagenase in benign and malignant breast disease. *Br. J. Cancer.* 67, 1126-1131.
28. Sato, H., Takino, T., Okada, Y., Cao, J., Shinagawa, A., Yamamoto, E. and Shiki, M. (1994) A matrix metalloproteinase expression on the surface of invasive tumor cells. *Nature (Lond).* 370, 61-65.
29. Yu, M., Sato, H., Seiki, M. and Thompson, E. W. (1995) Complex regulation of membrane-type matrix metalloproteinase expression and matrix metalloproteinase-2 activation by concanavalin A in MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Cancer Res.* 55, 3272-3277.
30. Thompson, E. W., Paik, S., Brunner, N., Sommers, C. L., Shima, T. B., Torri, J., Donahue, S., Lippman, M. E., Martin, G. R. and Dickson, R. B. (1992) Association of increased basement membrane-invasiveness with absence of estrogen receptor and expression of vimentin in human breast cancer cell lines. *J. Cell. Physiol.* 150, 534-544.
31. Azzam, H. S., Arand, G. A., Lippman, M. E. and Thompson, E. W. (1993) MMP-2 activation potential associates with metastatic progression in human breast cancer cell lines, and is independent of MMP-2 production. *J. Natl. Cancer Inst.* 85, 1758-1764.
32. Lee, K. S., Rha, S. Y., Kin, S. J., Kin, J. H., Roh, J. K., Kim, B. S. and Chung, H. C. (1996) Sequential activation and production of matrix metalloproteinase-2 during breast cancer progression. *Clin. Exp. Metastasis.* 14, 512-519.

33. Moy, L. Y. and Billings, P. C. (1994) A proteolytic activity in a human breast cancer cell lines which is inhibited by the anticarcinogenic Bowman-Birk protease inhibitor. *Cancer Lett.* 85, 205-210.

第二部份：

老鼠肉瘤細胞(Sarcoma 180)中蛋白脢之活化與
Bowman-Birk 和 Kunitz 蛋白脢抑制劑的關係

Proteolytic activities in mouse sarcoma 180 cells that were
inhibited by the Bowman-Birk and Kunitz
protease inhibitors

中山醫學院生物化學研究所

指導教授：謝易修 博士(Yih-Shou Hsieh, Ph.D.)

研究生：林麗娟 (Li-Jen Lin)

中文摘要

利用 zymography 的方法分析老鼠 sarcoma 180 (S-180)細胞中需
要先被 trypsin 活化才具有活性，而且會受 BBI 和 ACTI 所抑制的二
個蛋白酶，其分子量分別為 46 kDa 和 62 kDa，主要位於細胞質中，
pH optimal 分別為 7 和 8。由於其會受 DFP、BBI 和 ACTI 抑制活
性，但不受 EDTA 和 TPCK 所影響，故此二個蛋白酶為 trypsin-like
serine proteases，並且可能是蛋白酶抑制劑(BBI 和 ACTI)在細胞內的
target enzymes。62 kDa 蛋白酶的先驅物在 S-180 solid 和 soft tumor
中有明顯的增加，然而 46 kDa 蛋白酶的先驅物反而幾乎不存在，由
此可知這二個 serine proteases 在腫瘤的侵襲中有一個重要的生理角
色。

英文摘要

In this study, using zymogram analysis two proteolytic activities were identified in the mouse sarcoma 180 (S-180) cells that were activated by trypsin treatment and inhibited by both BBI and ACTI. These enzymes, with molecular weights of 46 kDa (dominant band) and 62 kDa (minor band), were mainly localized in the cytosol, and had optimal activity at pH 7 and 8 respectively. Their inhibition by DFP, BBI and ACTI but not EDTA and TPCK indicated they were trypsin-like serine proteases and may be the intracellular target-enzymes of protease inhibitors. The level of the precursor of the 62 kDa protease was significantly increased in the S-180 solid and soft tumors, whereas the level of the 46 kDa precursor was almost undetectable, implying that a physiological role may be played by these serine proteases during tumor invasion.

緒 言

蛋白酶抑制劑 (protease inhibitor) 是 cancer chemoprevention 中最具潛力的藥劑。依據流行病學的研究，在大量攝取豆類的地區，其人民罹患乳癌、大腸癌、胰臟癌以及攝護腺癌的比例較其它地區為低^(1,2)。而豆類已知富含高劑量的蛋白酶抑制劑。在生物體內和生物體外的實驗模式中也已證實蛋白酶抑制劑具有抑制癌生成的能力 (suppression of carcinogenesis)^(3,4)。

癌症的 chemoprevention 的定義：能干擾或延遲實驗動物腫瘤發展的過程，並且最後可以運用到人類的身上。有幾種 chemopreventive 的方式：1. 抑制 carcinogens 的形成 2. 干擾 carcinogens 的活化 3. 抑制細胞 transformation 或抑制 tumor 的 promotion。而維他命 A、抗氧化物如 selenium、 α -tocopherol、hindered phenolic antioxidants、anti-inflammatory agents 和蛋白酶抑制劑等都有 chemopreventive 的生物活性⁽⁵⁾。

蛋白酶抑制劑以各種不同型式存在許多的組織中(含動物和植物界)，雖然它們在生物和營養方面的功能尚未清楚，但它們主要的生理功能似乎是預防可造成傷害的蛋白水解。例如人類的 α 1-trypsin inhibitor，其存在血液中可以預防肺氣腫。然而此抑制劑在抽菸者身體中會被破壞掉^(6,7,8)。因香煙中的顆粒可以活化會造成 superoxide anions (O_2^-) 和 H_2O_2 (hydrogen peroxide) 的 PMN³ 或巨噬細胞。而 H_2O_2 會與 myeloperoxidase 反應而將 α 1-trypsin inhibitor 的 methionine 氧化，使 α 1-trypsin inhibitor 喪失活性⁽⁹⁾。在有肺氣腫的抽菸者和有發生肺癌條件的人，都可看到沒有活性的 α 1-trypsin inhibitor。

以下先介紹蛋白酶抑制劑的抗癌成效：1. 老鼠的皮膚實驗模式中已證實，PMN 所造成的 superoxide anion 可以被蛋白酶抑制劑、固

醇類和 retinoids 所抵消^(10,11,12)； 2. 在實驗老鼠的飲水中添加合成的蛋白脢抑制劑(ϵ -aminocaproic acid)，可以抑制由 dimethylhydrazine 所誘發的大腸癌⁽¹³⁾； 3. 飲食中含有高劑量的蛋白脢抑制劑可以降低乳癌、大腸癌、攝護腺癌、口腔癌以及 pharyngeal cancer⁽¹⁴⁾。

然而蛋白脢抑制劑大多數都是利用抑制 chymotrypsin 的活性，來達到預防癌症⁽³⁾。在生物體外測試蛋白脢抑制劑的 radioprotective 效果，發現蛋白脢抑制劑可以到達特殊的位置行使其抗癌的活性⁽¹⁵⁾。例如在大腸癌中，所攝取的蛋白脢抑制劑以高濃度狀態存在大腸中，而且在沒有癌細胞的大腸壁上有活化態的蛋白脢抑制劑⁽¹⁵⁾。然而有些蛋白脢抑制劑無法抑制 gastric carcinogenesis，因為蛋白脢抑制劑的抑制活性會受 PH 值影響，而它們無法在酸性的胃部中有活性或行使抗癌作用，但是 Bowman-Birk protease inhibitor (BBI) 可以降低 gastric cancer⁽¹⁶⁾。

對於蛋白脢抑制劑如何行使其抗癌活性的機制仍然所知有限，然而已知蛋白脢抑制劑有幾項功能被認為和蛋白脢抑制劑的抗癌作用有關： 1. 影響某些 oncogenes 的表現能力，如 *c-myc*、*c-fos*； 2. 影響某些蛋白脢的分解活性，如 N-t-butoxy-carbonyl-Val-Pro-Arg-7-amino-4-methylcoumarin-hydrolyzing activity，這些蛋白脢在暴露於致癌物的組織中都有很高的量⁽¹⁷⁾。

雖然蛋白脢抑制劑有許多種推測抑制腫瘤的方式，然大多數然認為他們可能抑制了可活化在 induction or expression of the transformed phenotype 中很重要的細胞內蛋白脢如 growth factor。許多的 growth factor 是以非活化態的先驅物被合成出，並且需要 posttranslation modification，也就是需要蛋白脢的作用，將無活性的 growth factor 變成有活性狀態^(18,19)。像非 transformed 的 C3H/10T_{1/2} 細胞要變成 transformed 可能需要 immature growth factors 由蛋白脢分解變成

mature form。而蛋白酶抑制劑也可以抑制癌生成的啓始(initiation)和促進(promotion)階段，利用停止癌生成的 ongoing process⁽¹⁷⁾。例如合成的蛋白酶抑制劑抑制老鼠皮膚 two-stage 的癌生成之 promotion^(20,21)。同時蛋白酶抑制劑在活體內和活體外的實驗模式中，也是個強烈的抗 promotional^(20,21) 試劑。

蛋白酶抑制劑可以改變在癌細胞生成時具有重要角色且由致癌物所誘發的細胞性改變，使這細胞性的改變變成正常細胞時的狀態。蛋白酶抑制劑需要在細胞正在增殖時加入才會有抑制 transformation 的效果。如蛋白酶抑制劑就對已 transformation 的融合瘤細胞無抑制的效果^(22,23)。

在許多的蛋白酶抑制劑的抗癌研究中，其中以大豆中的 Bowman-Birk protease inhibitor (BBI)被研究最廣泛且深入。大豆的 BBI 分子量為 8,000 daltons，具有抑制 trypsin 和 chymotrypsin 的活性位置⁽³⁾，但是只有 chymotrypsin-inhibitory region 有抑制 transformation 的效果。BBI 以 dimer 形式存在溶液中，BBI 當要與蛋白酶結合時，dimer 會解離再以 1:1 的方式與蛋白酶形成複合物。BBI 家族的成員都是含有非常穩定雙硫鍵的蛋白質，廣泛存在所有豆類植物中⁽²⁴⁾，而且 BBI 在煮或者分解(消化)過程中仍是十分穩定^(15,25)。因此 BBI 經咀嚼後進入胃部不會被胃分解，而是以未活化態形式保留著，再在小腸中以蛋白酶抑制劑活化態和蛋白酶(如 trypsin、chymotrypsin)形成複合物。而且 BBI 不會被吸收和進入血液中，只有少量的 BBI 被吸收，最終 BBI 被濃縮在尿液中被排出體外，而此時的 BBI 不能再與 trypsin 和 chymotrypsin 結合^(15,26)。

BBI 可以特殊性的抑制由 ionizing radiation 所造成的 transformation，而此抗癌(anti-carcinogenesis)機制是因吸收的蛋白酶抑制劑，可能間接部份抑制了蛋白的吸收。已知高蛋白和高脂類的攝

取可以增加癌症的發生。即使低攝取脂類但無攝取豐富的豆類，一樣不會降低癌症的發生⁽¹⁵⁾。而 BBI 也可以抑制 1. 在生物體外由致癌物所誘發的 transformation^(15,27)； 2. 由 dimethylhydrazine 所誘發老鼠的大腸癌⁽²⁸⁾； 3. 由 7,12-dimethylbenz (a) anthracene (DMBA) 所誘發老鼠的 cheek pouch carcinogenesis⁽²⁹⁾； 4. 由輻射線或化學致癌物 (benzo (a) pyrene 和 β -propiolactone) 所誘發 BALB/3T3 細胞的 transformation⁽³⁰⁾； 5. 當 BBI 存在於正在成長中的 Bloom syndrome (BS) 細胞時，可有效減少 BS 細胞中自發性的染色體變性⁽³¹⁾。

Bloom syndrome (BS) 是個正染色體隱性遺傳疾病，具有高量的染色體變性和 sister chromatid 的改變，而此一特徵使 BS 個體較正常人易得癌症⁽³²⁾。

而 BBI 可利用各種不同處理動物的方式達到抗癌的效果：1. 局部給予 BBI 可抑制由 DMBA 誘發的 cheek pouch carcinogenesis⁽³³⁾； 2. 注射 BBI 可以抑制由 3-methylcholanthrene 誘發的肺癌⁽³⁴⁾； 3. 餵食 BBI 可以抑制由 dimethylhydrazine 誘發的老鼠大腸癌和肝癌^(35,36,37)。

BBI 是以不可逆的方式抑制 transformation 的過程例如在由 radiation 誘發的 transformation 中已癌化數天的 cultures 內加入 BBI，仍可達到抑制的效果⁽²⁷⁾。而在先前的實驗中也指出，蛋白酶抑制劑不需要長時間存在於肺部，就已有抗癌活性⁽³⁸⁾。而 BBI 以 nanomolar 的濃度就可以抑制由輻射線所誘發的 C3H/10T_{1/2} 老鼠胚胎纖維母細胞的 transformation⁽²⁷⁾。

終結 BBI 的抗癌效果：1. 可抑制由各種不同型式的致癌物所誘發的癌症； 2. 可抑制三種不同物種的癌症 (mice、rats 和 hamsters)； 3. 可抑制不同的組織和器官如大腸、肺、肝、esophagus 和 cheek pouch (oral epithelium) 所產生的癌症； 4. 以各種不同的方式給予動物

(包含飲食)都可達抑制的效果； 5. 可抑制不同型態的腫瘤如：squamous cell carcinomas、adenocarcinomas 和 angiosarcomas 等； 6. 可抑制不同型態細胞產生的癌症如：a. 上皮細胞：大腸、肺、肝、esophagus 和 cheek pouch； b. 連結組織細胞：纖維母細胞⁽¹⁸⁾。

然而對於 BBI 如何行使其抗癌活性的機制，目前尚不清楚。但是有些學者推測 BBI 的抗癌機制乃是藉由抑制在 induction and /or expression transformed phenotype 時所需要的細胞性蛋白酶。如先前的報告指出 BBI 可能和 lysosomal enzyme 作用⁽⁴⁰⁾，因為成長中的 C3H/10T_{1/2} 細胞會攝取 BBI，而且將 BBI 濃縮在細胞內的液胞中，但是無直接證據證實此液胞就是 lysosomes。lysosomal/Golgi 酵素在癌症細胞的發展之角色尚不清楚，然而 lysosomal 酵素在細胞內對於蛋白質的 turnover 方面具有重要的角色。在 C3H/10T_{1/2} 細胞中的兩個蛋白酶可能和細胞內蛋白的 turnover 有關。而蛋白酶抑制劑可以擾亂蛋白的 turnover，進而阻礙或抑制了 transformed phenotype 的發展 lysosomal/Golgi 的酵素在蛋白的 processing 方面可能也有作用⁽⁴¹⁾。然 BBI 和其他具有抗癌性的蛋白酶抑制劑可以抑制如 peptide hormones 或 growth factors 類的細胞性蛋白質的 processing，而 peptide hormones、growth factor 伴隨 transformed phenotype 的 induction and /or expression⁽³⁹⁾。

在 human-derived (1522、BS) 和 mouse-derived (C3H/10T_{1/2}) 細胞中都有相似的二個蛋白酶存在，BBI 可能和這二個蛋白酶作用或是這二個蛋白酶先形成 dimer 後再和 BBI 作用。然而猜想 BBI 在老鼠和人類的纖維母細胞中可以和相似的蛋白酶作用，更進一步的說明，具有抗癌性的蛋白酶抑制劑的共同標的酵素存在不同物種的纖維母細胞之相同 subcellular location⁽³⁸⁾。

另外一種具有抗癌活性的蛋白酶抑制劑，*Acacia confusa* trypsin

inhibitor (ACTI)，是從 *Acacia confusa* 分離出，屬於 Kunitz family two-chain trypsin inhibitor，ACTI 可強烈的抑制 trypsin，但對於 chymotrypsin 的抑制能力就比較弱。ACTI 和 BBI 一樣可以藉由 concanavalin A (con A) 或 abrin-a 的 B chain 將兩者帶入細胞內而抑制 sarcoma 180 cell 的生長。

基於在腫瘤的發展中蛋白酶扮演了重要的角色，並且透過蛋白酶的活化 cascade 來啟動腫瘤的侵襲和轉移。然而對於蛋白酶如何作用以及具有不錯抗癌活性的蛋白酶抑制劑如何抗癌，二者的機制尚且不清楚，有許多的學者推測蛋白酶抑制劑藉由抑制一個或多個在誘發和表現 transformed phenotyp 中必需有的細胞內蛋白酶。因此我們利用可在老鼠腹腔中大量繁殖的腫瘤細胞 sarcoma 180 cells，來研究已癌化細胞中的蛋白酶。

實驗方法

1. S-180 細胞的 maintain

1. 取 2×10^7 個老鼠 sarcoma 180 (S-180) 細胞注入雄性 ICR 老鼠的腹腔中
- 2) 於三個星期之後，由腹腔取出 S-180 細胞，部份的 S-180 細胞會聚集在一起並且附著在組織上，這些型態的 S-180 細胞稱為 soft tumor
- 3) soft tumor 細胞先用 PBS 清洗後用震盪方式使 soft tumor 分散成懸浮狀態
- 4) solid tumor 是來自將 5×10^6 個老鼠 S-180 細胞皮下注射到 ICR 老鼠右邊腹股溝的區域，一個月之後取出 tumor，並且將結締組織除掉後用 PBS 清洗並且研磨

2. S-180 細胞研磨液的製備

- 1) S-180 細胞從腹腔抽出，用 PBS 清洗後於 4°C 下離心 $1,000 \times g$ 10 分鐘
- 2) 沈澱的細胞用 PBS 清洗二次，並且再用等體積的 PBS 再懸浮
- 3) 細胞在冰上用研磨器 (Konetes homogenizer) 研磨 (30 strokes)，研磨液置於冰上 10 mins 後，於 4°C 下離心 $14,000 \times g$ 30 分鐘，取上清液儲存在 -80°C 備用，以進行 Zymogram protease assays

3. Bradford protein assay 蛋白分析

實驗方法及步驟同 pp13 (Zymogram Protease Assays)

4. 各種不同的蛋白酶活化 S-180 細胞研磨液的分析
以懸浮的 S-180 細胞當檢體，實驗方法及步驟同 pp21

5. 不同 trypsin : substrate 比例 (W : W) 活化 S-180 細胞研磨液
的蛋白酶活性分析

以懸浮的 S-180 細胞當檢體

1) 0.1 % gelatin-8% SDS-PAGE 配製

2) 各種不同比例的 trypsin : substrate 的配製

trypsin : substrate 比例 (W:W)	1:500	1:1000	1:2000	1:4000	1:8000	1:16000	1:32000
trypsin 濃度(ng/μl)	10	5	2.5	1.25	0.625	0.3125	0.15625
檢體體積(25μg)	15 μl						
trypsin 用量	5 μl						
處理時間	37 °C , 30 分鐘						
5 X loading buffer	5 μl						
全部體積	25 μl						
loading 體積	10 μl						

3) 進行 zymography 分析：150 伏特，2.5 小時

4) 電泳後凝膠之處理同 pp15

6. 細胞質的分層

1) S-180 細胞從腹腔抽出，用 PBS 清洗後於 4 °C 下離心 1,000xg
10 分鐘

2) 取細胞置於冰上並且用冰的 isotonic sucrose buffer (10 mM Tris-
HCl, pH 7.0 , 250 mM sucrose , 1 mM MgCl₂) 懸浮之後以研磨器

研磨

- 3)取研磨液於 4 °C 下離心 1,000 xg 60 分鐘，取上清液而沈澱物再加入 1 ml PBS 懸浮後，再於 4 °C 下離心 1,000 xg 10 分鐘，取部份上清液及沈澱物存於 -80 °C 備用
- 4)取步驟 3 的上清液再分離，於 4 °C 下離心 10,000 xg 60 分鐘，取上清液而沈澱物再加入 1 ml PBS 懸浮後，再於 4 °C 下離心 10,000 xg 10 分鐘，取部份上清液及沈澱物備用以作 zymography 實驗
- 5)取步驟 4 的上清液再於 4 °C 下離心 100,000 xg 60 分鐘，取沈澱物加入 1 ml PBS 懸浮後，再於 4 °C 下離心用 100,000 xg 10 分鐘，取上清液和沈澱物置 -80 °C 備用
- 6)利用 Bradford protein assay 蛋白分析，作法同 pp 13
- 7)進行 SDS-聚丙烯醯氨板膠電泳法，作法同 pp 15

7. FPLC 分子篩濾層析法(FPLC gel filtration chromatography)

以懸浮 S-180 細胞當檢體，實驗同 pp 16

8. Optimal pH 的測定

以懸浮 S-180 細胞當檢體，實驗同 pp 16

9. 蛋白酶抑制劑抑制蛋白酶的效果

以懸浮 S-180 細胞當檢體，實驗同 pp 17

10. Reverse zymography 分析(以測定 trypsin inhibitors)

- 1)0.1% gelatin-10% SDS-PAGE 配製
- 2)取 20 μ l 檢體(50 μ g)加入 5 μ l 5X loading buffer(不含 β -MSH 或其它 reducing agents)，mix 後取 20 μ l loading 到已凝固之板膠
- 3)進行 zymography 分析：150 伏特, 2.5 小時

電泳後 gel 之處理

- 1)取出 gel 加入 50 ml washing buffer (2.5% Triton X-100 in dH₂O)在室溫洗 30 分鐘 (gyrotory shaker),再換一次 100 ml washing buffer 洗 30 分鐘
- 2)倒掉 washing buffer , 以 dH₂O rinse 再加入 100 ml incubation buffer (50 mM Tris-HCl , pH 8.0 , 5 mM CaCl₂ , 0.02% NaN₃ , 0.15 M NaCl), 再加入 100 μ l trypsin (1 mg/ml)後, 置於 37 °C 恆溫箱中反應 1 小時
- 3)倒掉溶液後 gel 先用 incubation buffer 清洗二次, 再加入新的 100 ml incubation buffer , 置於 37 °C 恆溫箱中反應 12 小時
- 4)gel 用 0.25 % Coomassie brilliant blue R-250 染色液 1 小時, 再用退色液退色

11. 還原劑對 S-180 zymography 之影響分析

1) 檢體的配製

檢體種類	S-180				Soft tumor			
	-	+	-	+	-	+	-	+
檢體體積(25 μ g)	10 μ l	5 μ l	15 μ l	10 μ l	10 μ l	5 μ l	15 μ l	10 μ l
15% β -MSH 用量	5 μ l		0		5 μ l		0	
trypsin (25 ng)	0	5 μ l	0	5 μ l	0	5 μ l	0	5 μ l
5 X loading buffer	5 μ l							
全部體積	25 μ l							
apply 體積	10 μ l							

2) 進行 electrophoresis : 150 伏特, 2.5 小時

3) 電泳後凝膠之處理同 pp 15

實驗結果

一、不同的蛋白酶活化 sarcoma 180 研磨液的分析

利用 Zymography 的方法，在 S-180 細胞研磨液中出现一個主要的 gelatinase，分子量大約為 93 kDa (Lane 1)。然而 S-180 細胞研磨液先用 trypsin 處理再進行 zymogram 分析，則會出現另外二個 gelatinases，其分子量分別是 62 和 46 kDa，但原先的 93 kDa gelatinase 不受影響(Lane 2)。為了研究是否其他的蛋白酶也能像 trypsin 一樣活化 62 和 46 kDa gelatinase，所以我們也將 S-180 細胞研磨液先用 chymotrypsin、proteinase K、nargase、thermolysin (後兩者 data not show)處理，但是結果這 4 種蛋白酶無法活化 62 和 46 kDa gelatinase。(圖一)

二、不同 trypsin : substrate 比例(W : W)活化 S-180 細胞研磨液之 gelatinase 的活性分析

由圖一可知 trypsin 可以活化 62 和 46 kDa gelatinase，又已知 enzyme 和 substrate 之間是以一定的比例在作用，故想要了解 trypsin 在何種比例之下，可以活化 62 和 46 kDa gelatinase 達最大的活性值。結果在 trypsin : gelatinase = 1 : 1000(W : W)的情況下，會同時出現 62 和 46 kDa gelatinase 的活性。如果 trypsin 的量過多，則會將 93 和 62 kDa gelatinases 分解掉，然 trypsin 的量太少，則無法活化出 62 kDa gelatinases 的活性。由曲線圖可看到 46 kDa gelatinase 的量在 trypsin : gelatinase = 1 : 1000(W : W)時活性最大，並且隨著 trypsin 的量降低而活性隨之降低。(圖二)

三、細胞的分層

欲知 93、62 和 46 kDa gelatinase 在細胞中的位置，因此利用離心力將細胞研磨液分成 3 層，並且每一層皆用有 trypsin 處理和無 trypsin 處理再一起進行電泳分析。結果可被 trypsin 活化的 62 和 46 kDa gelatinase 主要出現在細胞質的部份(100,000 xg 上清液，100 KS)，但仍有少量甚至不出現在其他分層。而 93 kDa gelatinase 則在每一分層都有出現(圖三)。

四、FPLC 分子篩濾層析法

62 和 46 kDa gelatinase 需要先經 trypsin 活化才具有活性，因此要知道 62 和 46 kDa gelatinase 在細胞質中是以何種 proenzyme form 存在，所以利用 FPLC 的方法，將這三個 gelatinases 以 proenzyme form 的形式分離出。結果：B 圖是 S-180 細胞研磨液未經 trypsin 活化直接通入 FPLC 之後，再將所收集的 fractions 用 trypsin 處理再進行電泳分析。而 C 圖則是 S-180 細胞研磨液先經 trypsin 活化後再通入 FPLC，而所收集的 fractions 就直接進行電泳分析。62 和 46 kDa gelatinase 分別出現在 B、C 二圖中(通入 FPLC 之前無 or 有先用 trypsin 處理)各自相同的 fractions，分別是 32-33 和 35-37，與 A 圖標準分子量相對其分子量分別是 66 和 45 kDa，因此可知 62 和 46 kDa gelatinase 是以相近的分子存在細胞質中。而 93 kDa gelatinase 在 B、C 二圖中也是以相同的 fractions 出現(27-28)，分子量約 200 kDa，故推測在自然狀態下 93 kDa gelatinase 是以 dimer form 存在。(圖四)

五、S-180 細胞研磨液中 93、62 和 46 kDa gelatinase optimal pH 值的測定

爲了了解 93、62 和 46 kDa gelatinase 在何種 pH 值下會有最大的活性值，因此利用各種不同 pH 值的緩衝液做反應。結果得知：46 kDa gelatinase 主要的活性廣泛出現在 pH 6-10 之間，而其最大活性出

現在 pH 7。93 kDa gelatinase 的活性出現在 pH 7-8 中，以 pH 8 活性最高。至於 62 kDa gelatinase 的主要活性出現在 pH 7-9 中，也是以 pH 8 活性最高。(圖五)

六、蛋白酶抑制劑抑制 S-180 細胞研磨液中之 93、62 和 46 kDa gelatinase 活性的分析

藉由各種蛋白酶抑制劑的抑制效果，可以了解 93、62 和 46 kDa gelatinase 是屬於那一類的蛋白酶。結果 DFP、BBI 和 ACTI 可以抑制 62 和 46 kDa gelatinase 的活性，由此可知這二個 gelatinase 具有 serine protease 的特徵。至於 93 kDa gelatinase 則只受 EDTA 所抑制，故其為 metalloproteinase。然而 TLCK、TPCK、PMSF 對這三種 gelatinases 活性的影響並不大。(圖六)

七、比較正常老鼠與感染 S-180 老鼠的器官中 gelatinase 的表現

欲進一步了解 93、62 和 46 kDa gelatinases 在各種器官中的表現情形，所以就取腦、肺、心、肝、腎、脾等器官的研磨液來分析。結果 A 圖未先用 trypsin 活化的正常或感染 S-180 老鼠中的肺、肝、腎、脾只出現 93 kDa gelatinase，而且是以脾臟最多，肺臟次之，但是在腦和心臟中卻沒有 93 kDa gelatinase 的活性。至於先用 trypsin 活化的器官研磨液中(B 圖)，93 kDa gelatinase 表現如 A 圖，而 62 kDa gelatinase 的活性則都很高，並且具有規則性：在感染 S-180 老鼠的器官中的活性高於相對的正常老鼠中的器官。但是 46 kDa gelatinase 雖都有表現，但比較無明顯差異性(圖七)。

八、93、62 和 46 kDa gelatinase 在 S-180 細胞的不同階段之表現

由圖七知道 62 kDa gelatinase 在感染 S-180 老鼠的器官中之活性

大於正常老鼠的器官，而 93 kDa gelatinase 的表現則反之，因此想要更深入的研究這三種 gelatinases 在 S-180 細胞侵襲過程中所可能扮演的角色。所以利用三種不同型態的 S-180 細胞做腫瘤侵襲的模擬分析：1. S-180 細胞：懸浮在腹腔中(S-180 細胞的最初狀態)；2. soft tumor：懸浮的 S-180 細胞最後會聚集在一起，並且附著在組織周圍(開始侵襲)；3. solid tumor：以皮下注射的方式將 S-180 細胞注入腹股溝的皮下(侵襲)。結果在 soft 和 solid tumors 中不需要 trypsin 活化就出現一新的 65 kDa gelatinase 活性，而再用 trypsin 活化可使 65 kDa gelatinase 的活性增加。同時在 soft 和 solid tumors 中的 62 kDa gelatinase 活性比在 S-180 細胞中增強許多，但是 46 kDa gelatinase 的活性反而變弱。而 93 kDa gelatinase 也在 soft 和 solid tumors 中增強活性。因此總結而言：93、65 和 62 kDa gelatinases 在 soft tumors 中的活性最強，solid tumors 次之而 S-180 細胞中最弱；但是 46 kDa gelatinase 的活性卻是在 S-180 細胞中最強，solid tumor 中次之而在 soft tumor 中沒有活性。由此可知 46 和 62 kDa gelatinase 與腫瘤的侵襲有著顯著的關係。(圖八)

九、Reverse zymography 分析(以測定 trypsin inhibitors)

有許多的文獻已指出在腫瘤的侵襲和轉移過程中會有蛋白酶和蛋白酶抑制劑表現量增加的現象，因此由圖八已了解 S-180 細胞、soft tumor 和 solid tumor 中蛋白酶的變化情況，而這蛋白酶抑制劑是否也有相對應的改變？所以利用 reverse zymography 分析蛋白酶抑制劑。結果蛋白酶抑制劑在 S-180 細胞、soft tumor 和 solid tumor 中並無變化。(圖九)

十、還原劑對 93、65、62 和 46 kDa gelatinase 活性的影響

蛋白酶的活性大部分是位於雙硫鍵中，因此利用 β -MSH 還原劑

(破壞雙硫鍵)來了解這些 gelatinases 的活性位置。結果 β -MSH 可使 gelatinase 喪失活性。

十一、不同 trypsin : substrate 比例(W : W)活化 soft tumor 研磨液之 gelatinase 的活性分析

由圖八可知 trypsin 可以活化 65 和 62 kDa gelatinase，故想要了解 trypsin 在何種比例之下，可以活化最大的 65 和 62 kDa gelatinase 活性值。結果在 trypsin : gelatinase = 1 : 1000(W : W)的情況下，只會出現適當的 93、65 和 62 kDa gelatinase 的活性，不像 trypsin 的量過多會出現一些雜 bands，然 trypsin 的量太少，則又會使活性變低。由曲線圖可看到 65 和 62 kDa gelatinase 的量在 trypsin : gelatinase = 1 : 500 和 1 : 250 (W : W)時活性最大，並且隨著 trypsin 的量降低而活性隨之降低。93 kDa gelatinase 則是不管 trypsin 量的變化，仍維持平穩的高活性狀態。(圖十一)

十二、soft tumor 的 FPLC 分子篩濾層析法

62 kDa gelatinase 需要先經 trypsin 活化才具有活性，而 65 kDa gelatinase 經 trypsin 活化可增加 2 倍的活性，因此想要知道 65 和 62 kDa gelatinase 在細胞質中是以何種 proenzyme form 存在，所以利用 FPLC 的方法，將這三個 93、65 和 62 kDa gelatinases 以 proenzyme form 的形式分離出。結果：B 圖是 soft tumor 研磨液未經 trypsin 活化直接通入 FPLC 之後，再將所收集的 fractions 用 trypsin 處理再進行電泳分析。而 C 圖則是 soft tumor 研磨液先經 trypsin 活化後再通入 FPLC，而所收集的 fractions 就直接進行電泳分析。65 和 62 kDa gelatinase 分別出現在 B、C 二圖中(通入 FPLC 之前無 or 有先用 trypsin 處理)相同的 fractions，分別是 32-33 和 31-34，而二者主要出現的 band 皆在

fraction 33，將其與 A 圖標準分子量相對二者的分子量皆是 76 kDa，因此可知 65 和 62 kDa gelatinase 是以相近的分子存在細胞質中。而 93 kDa gelatinase 在 B、C 二圖中也是以相同的 fractions 出現(27-28)，分子量約 200 kDa，故推測在自然狀態下 93 kDa gelatinase 是以 dimer form 存在。(圖十二)

十三、soft tumor 研磨液中 93、65 和 62 kDa gelatinase optimal pH 值的測定

爲了了解 93、65 和 62 kDa gelatinase 在何種 pH 值下會有最大的活性值，因此利用各種不同 pH 值的緩衝液做反應。結果得知：65 kDa gelatinase 的活性廣泛出現在 pH 7-10 之間，而 62 kDa gelatinase 的活性也廣泛出現在 pH 6-10 之間，93 kDa gelatinase 的活性則出現在 pH 7-8 中，這三者最大活性都出現在 pH 8。較特殊的是 62 kDa gelatinase 的活性在 pH 8、9、10 之間是呈現最大值狀態。(圖十三)

十四、蛋白酶抑制劑抑制 soft tumor 研磨液中之 93、65 和 62 kDa gelatinase 活性的分析

藉由各種蛋白酶抑制劑的抑制效果，可以了解 93、65 和 62 kDa gelatinase 是屬於那一類的蛋白酶。結果 TPCK、DFP、BBI 和 ACTI 可以抑制 50% 以上的 65 和 62 kDa gelatinase 活性，由此可知這二個 gelatinase 具有 serine protease 的特徵。但是 65 kDa gelatinase 也會受 EDTA 抑制達 80% 以上，因此也具有 metalloproteinase 的性質。至於 93 kDa gelatinase 則只受 EDTA 所抑制，故其爲 metalloproteinase。而 TLCK、PMSF 對這三種 gelatinases 活性的影響並不大。(圖十四)

討 論

在 S-180 老鼠的 sarcoma cell 中，我們分析二個需要 trypsin 活化的 46 和 62 kDa gelatinases，這二者可被 Bowman-Birk 和 Kuntiz-protease 所抑制。在進一步的研究中發現，46 和 62 kDa gelatinases 為細胞質內的蛋白，分別在 pH 7 和 pH 8 有最大的活性，並且受 DFP、BBI 和 ACTI 抑制活性。由此可知這二個 gelatinases 為 trypsin-like serine proteases，同時由於 EDTA 不能抑制它們的活性，所以這二者並非是 metalloproteinase，因此排除是 collagenases 的可能性。而有趣的是 46 和 62 kDa gelatinases 並不直接出現在細胞研磨液中，而是需要 trypsin 活化才會有活性。所以它們可能是以 proenzyme 的形式合成，並且需要一個 trypsin-like 的細胞內酵素將 proenzyme form 改變成 active form。所以我們就利用 FPLC 在自然情況下(native condition)，估算 46 和 62 kDa gelatinases 的先驅物之分子量大小。結果它們與其先驅物的分子量大小相似，這意味著先驅物只需要小小的修飾、改變，就足夠變成 active form。

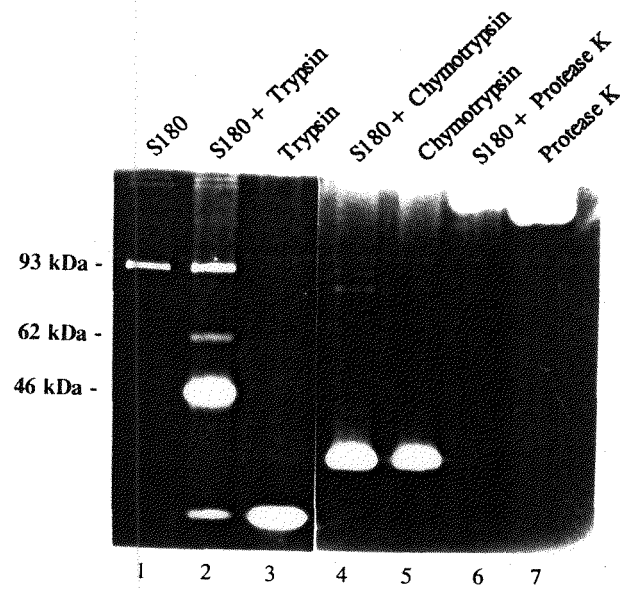
再者經由正常和感染 S-180 老鼠的各種器官中，發現在感染 S-180 的器官中，62 kDa gelatinases 的活性皆高於相對的正常器官，但是 93 kDa gelatinase 則剛好相反，因此藉由 zymography 分析 soft 和 solid tumors，以便了解 46、62 和 93 kDa gelatinases 可能扮演的重大生理角色，結果顯示 62 kDa gelatinase 的活性有明顯增加的情況，而 46 kDa gelatinase 反而顯著的消失。此推測當 S-180 細胞在侵襲之前被局限在皮下或是聚集在一起，可能會使先驅物的量有一特殊性的轉變，而這個先驅物正代表著，在惡性腫瘤細胞中 62 kDa gelatinase 的重要性。

也藉此進一步探討在 soft 和 solid tumor 中出現的新的 65 kDa gelatinase，以及在相同蛋白量和 trypsin 活化量下活性增強的 62 kDa gelatinase 的性質，結果 62 和 65 kDa gelatinase 的 pH optimal 也是在 pH 8，與先驅物分子量大小相近，因此也不需要太大的改變，活性就會大大提高。同樣的 65 和 62 kDa gelatinase 也會受 DFP、BBI 和 ACTI 所抑制，但有一點特殊就是 65 kDa gelatinase 也同時受 EDTA 抑制活性。換句話說 65 kDa gelatinase 不但是 trypsin-like Serine protease，另一方面也受二價離子調控。

然而在這些不同形式的腫瘤(S-180 cell、soft tumor 和 solid tumor) 中的 trypsin inhibitor 並無改變，因此我們的結果也和一些學者的假說符合：蛋白酶 / 蛋白酶抑制劑不平衡的 ratio，可能和腫瘤發展的階段(stage)有關連。

BBI 和 ACTI(二者皆是 trypsin inhibitors)會抑制 sarcoma 180 細胞的生長，而且當這二個抑制劑以共價鍵與 con A 或 abrin-a 的 B 鏈結合時，會大大提高被細胞攝取的量，進而增強抑制 S-180 細胞生長的效果。雖然抑制的機制尚不清楚，而這有可能是抑制劑藉由抑制在腫瘤細胞中參與誘發 transformed phenotype 的酵素，來達到抑制腫瘤細胞的生長。因此 46、62 和 65 kDa gelatinase 可能就是 anticarcinogenic 物質如 BBI 和 ACTI 作用的酵素。

圖表與圖表說明

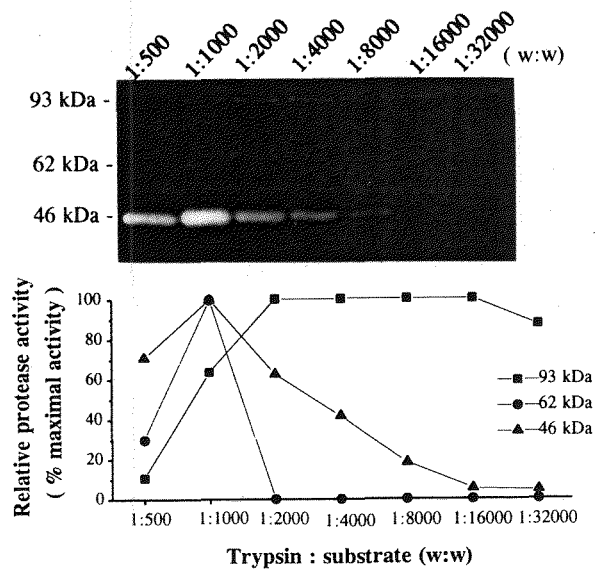


圖一、不同的蛋白酶活化 S-180 細胞之研磨液的 zymography 分析

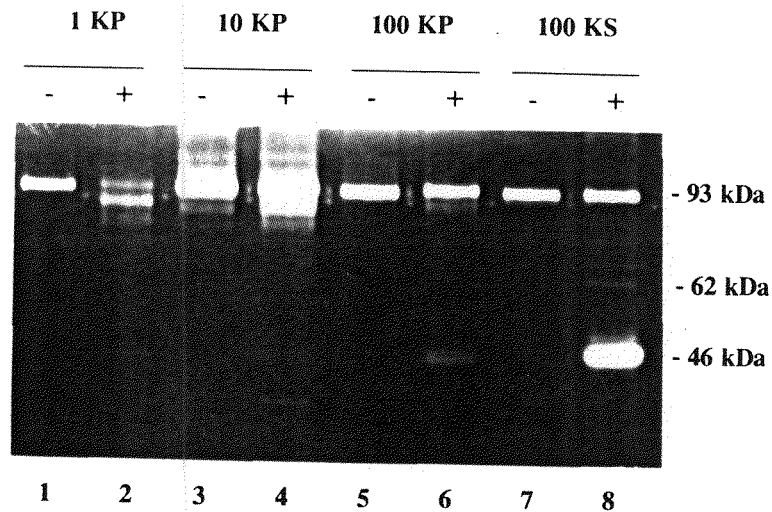
Lane 1 : S-180 細胞之研磨液未加 trypsin 活化

Lane 2、4、6 : S-180 細胞之研磨液分別加 trypsin、
chymotrypsin、proteainase K 活化 (W/W = 1000/1)

Lane 3、5、7 : 分別只有 trypsin、chymotrypsin、proteainase K



圖二、不同 trypsin : substrate 比例(W : W)活化 S-180 細胞之研磨液的 zymography 分析
嘗試找出最適當的 trypsin 量來活化在 S-180 細胞之研磨液中的 93、62、46 kDa 蛋白酶



圖三、偵測 93、62、46 kDa 蛋白酶在細胞中的位置

利用各種不同的離心力將 S-180 細胞作 subcellular fractions

Lane 1、2：研磨 S-180 細胞後，進行 1 K xg 離心後的沈澱物

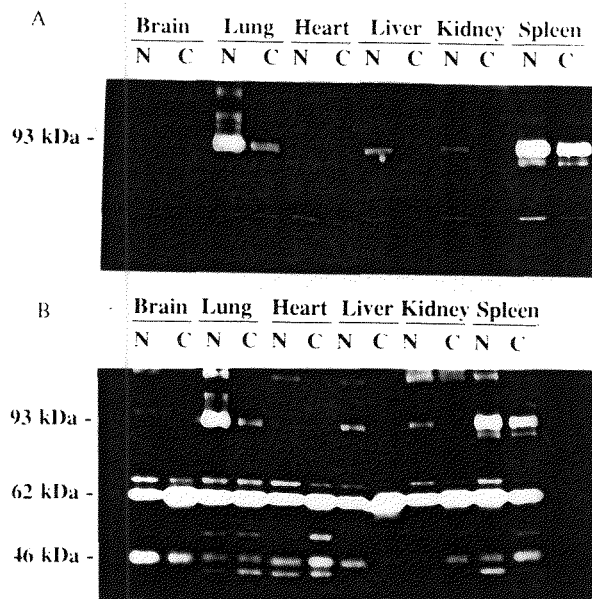
Lane 3、4：取 1000 xg 離心後的上清液，再進行 10 K xg 離心後的

沈澱物； **Lane 5、6**：取 10 K xg 離心後的上清液，再進行 100 K xg

離心後的沈澱物； **Lane 7、8**：取 10 K xg 離心後的上清液，再進

行 100 K xg 離心後的上清液。

＋：有加 trypsin 活化；－：未加 trypsin 活化



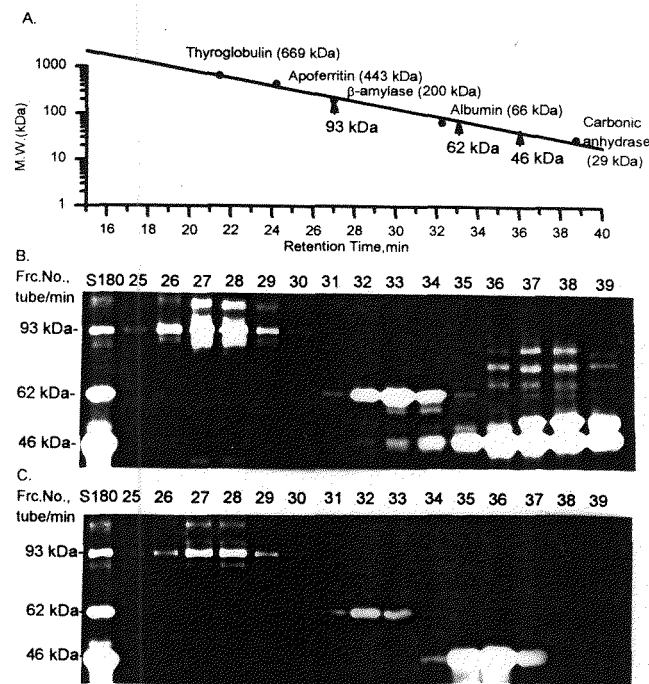
圖四、從正常老鼠和腹腔中有 S-180 細胞的老鼠體內取各種不同的組織作比較

A 圖：各個組織不加 trypsin 活化直接進行 zymography 分析

B 圖：各個組織先加 trypsin 活化再進行 zymography 分析

N：正常老鼠

C：腹腔中有 S-180 細胞的老鼠



圖五、FPLC 分子篩濾層析法

分析 93、62、46 kDa 蛋白酶在細胞內存在的形式

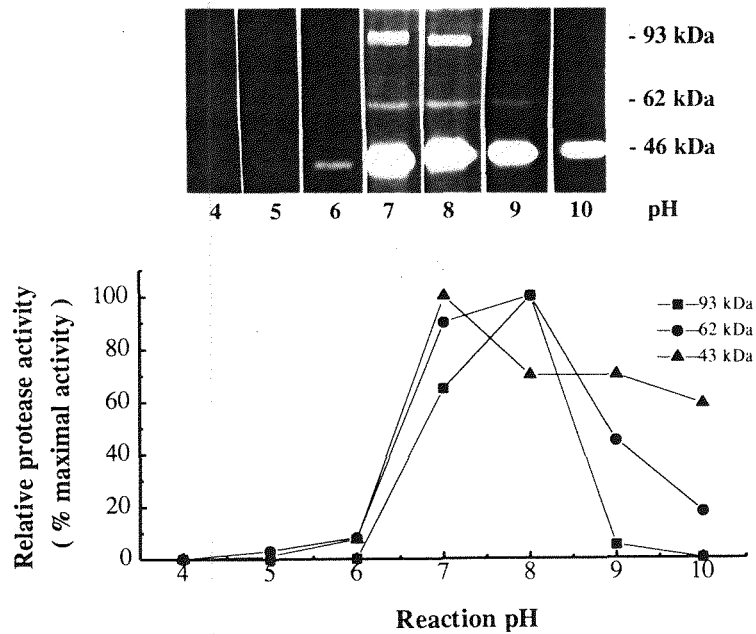
A 圖：標準分子量曲線圖

B 圖：S-180 細胞之研磨液直接通入 FPLC 中，以 PBS 為沖提液，每分鐘收集一管，每管 400 μ l，再取第 25 到 39 管 8 μ l 進行 zymography 分析

S 180：未通入 FPLC 的 S-180 細胞之研磨液(10 μ g)

C 圖：S-180 細胞之研磨液先加入 trypsin 活化後再通入 FPLC 中，條件同上，也是取第 25 到 39 管 8 μ l 進行 zymography 分析

S 180：未通入 FPLC 但已先用 trypsin 活化的 S-180 細胞之研磨液 (10 μ g)

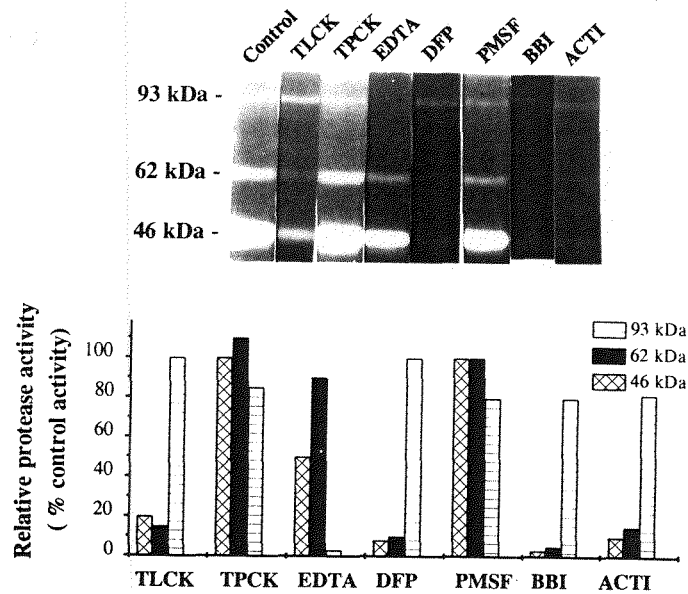


圖六、Optimal pH 值的測定

利用各種不同 pH 值的緩衝液，分析 93、62、46 kDa 蛋白酶活性的 pH 值範圍

上圖：電泳的結果

下圖：將電泳的結果利用 AlphaImager 2000，測每個蛋白酶的活性值。計算的方式以 93 kDa 蛋白酶為例：取其中最高的活性值當作 100%，而剩下的不同 pH 值的活性值再與之計算相對的百分比，如：不同 pH 值的活性值/最高的活性值 X 100 %



圖七、蛋白酶抑制抑制 93、62、46 kDa 蛋白酶活性的分析

可以了解 93、62、46 kDa 蛋白酶是屬於那一類蛋白酶

S-180 細胞之研磨液先進行電泳分析後，再分別加入不同的蛋白酶抑制反應

上圖：電泳的結果；下圖：電泳的結果利用 AlphaImager 2000, 測定每個蛋白酶被抑制後的活性值。計算的方式以 93 kDa 蛋白酶為例：

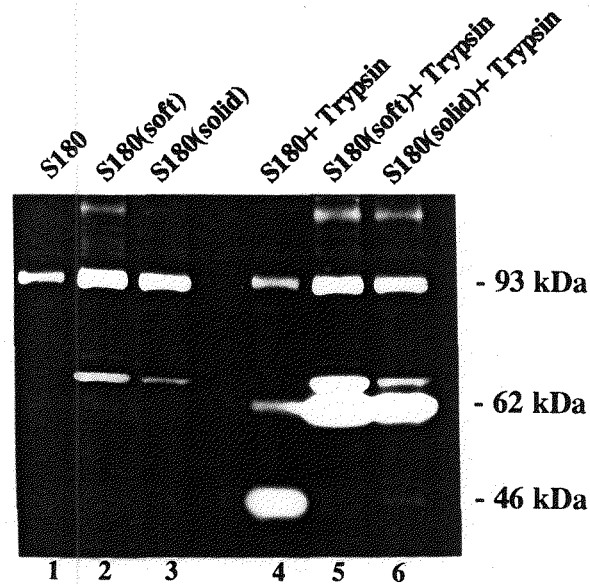
以 control 的 93 kDa 蛋白酶活性值為 100%，如：TLCK 抑制後的 93 kDa 蛋白酶活性值 / control 的 93 kDa 蛋白酶活性值 X 100%

5 mM DFP、PMSF：屬 serine protease inhibitor

4 mM TLCK：為 trypsin inhibitor；4 mM TPCK：為 chymotrypsin inhibitor；

20 mM EDTA：屬 metalloprotease inhibitor；350 μg DLTI：

屬 Bowman-Birk inhibitor (BBI)；350 μg ACTI：屬 Kunitz family inhibitor



圖八、觀察 93、62、46 kDa 蛋白酶在 S-180 細胞不同時期的變化

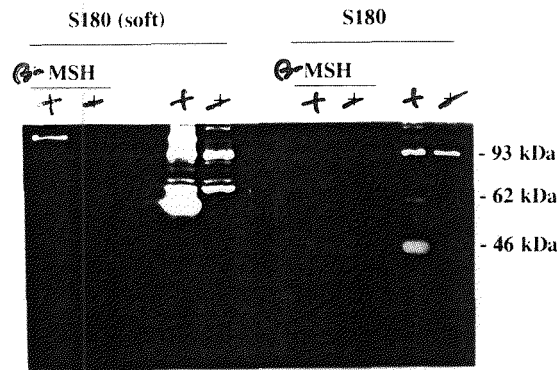
S180：S-180 細胞在老鼠腹部中以懸浮狀態存在

S180(soft)：懸浮的 S-180 細胞在三個星期後會聚集在一起並且附著在組織上

S180(solid)：S-180 細胞注射到老鼠的皮下，一個月後取出

Lane 1、2、3：檢體未加 trypsin 活化直接進行 zymography 分析

Lane 4、5、6：檢體先加 trypsin 活化再進行 zymography 分析



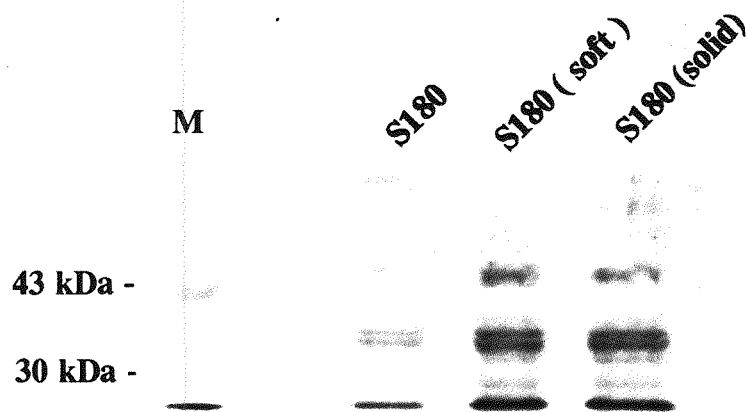
圖九、還原劑對 S180 細胞和 S180(soft)細胞中 93 、 62 、 46 kDa 蛋白酶活性的影響分析

3 % β - MSH : 還原劑，會將雙硫鍵還原成 free 的 SH group

十 : 檢體有用 trypsin 先活化 - : 檢體未加 trypsin 活化

S180 : S-180 細胞在老鼠腹部中以懸浮狀態存在

S180(soft) : 懸浮的 S-180 細胞在三個星期後會聚集在一起並且附著在組織上

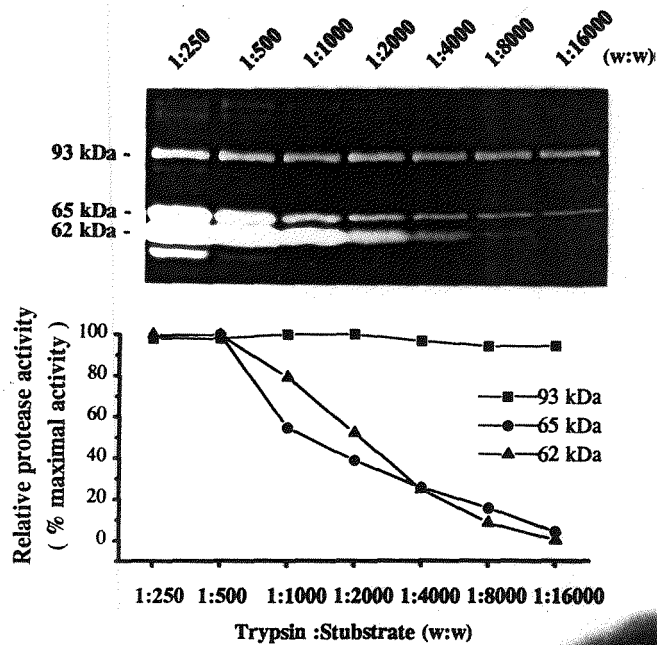


圖十、S180 細胞之研磨液以 reverse zymography 分析(以測定 trypsin inhibitor)

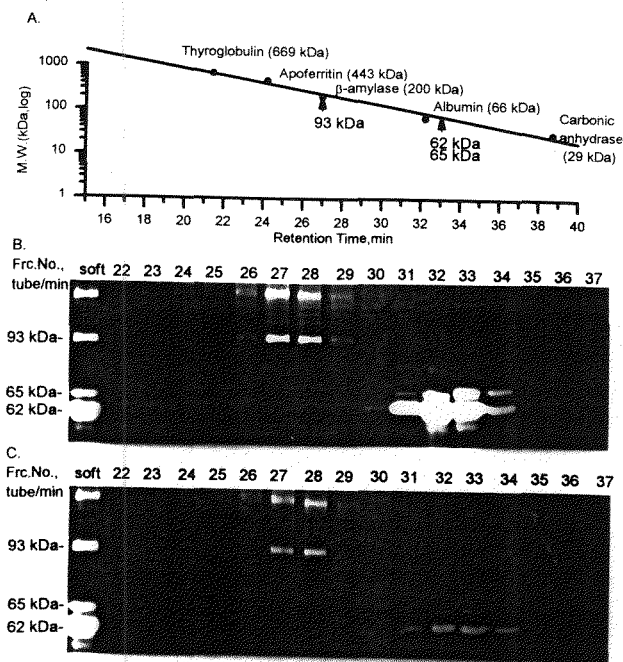
S180 : S-180 細胞在老鼠腹部中以懸浮狀態存在

S180(soft): 懸浮的 S-180 細胞在三個星期後會聚集在一起並且附著在組織上

S180(solid): S-180 細胞注射到老鼠的皮下，一個月後取出



圖十一、不同 trypsin : substrate 比例(W : W)活化 S180(soft)細胞之研磨液的蛋白酶活性分析
嘗試找出最適當的 trypsin 量來活化在 S180(soft)細胞之研磨液中的 93、65、62 kDa 蛋白酶



圖十二、FPLC 分子篩濾層析法

分析 93、65、62 kDa 蛋白酶在細胞內存在的形式

A 圖：標準分子量曲線圖

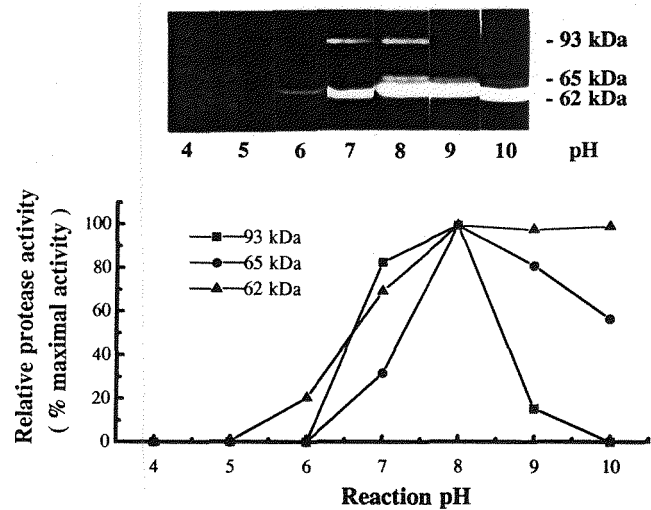
B 圖：S180(soft)細胞之研磨液直接通入 FPLC 中，以 PBS 為沖提液，每分鐘收集一管，每管 400 μ l，再取第 22 到 37 管 8 μ l 進行 zymography 分析

soft：未通入 FPLC 的 S180(soft)細胞之研磨液(10 μ g)

C 圖：S180(soft)細胞之研磨液先加入 trypsin 活化後再通入 FPLC

中條件同上，也是取第 22 到 37 管 8 μ l 進行 zymograph 分析

soft：未通入 FPLC 但已先用 trypsin 活化的 S180(soft)細胞之研磨液 (10 μ g)

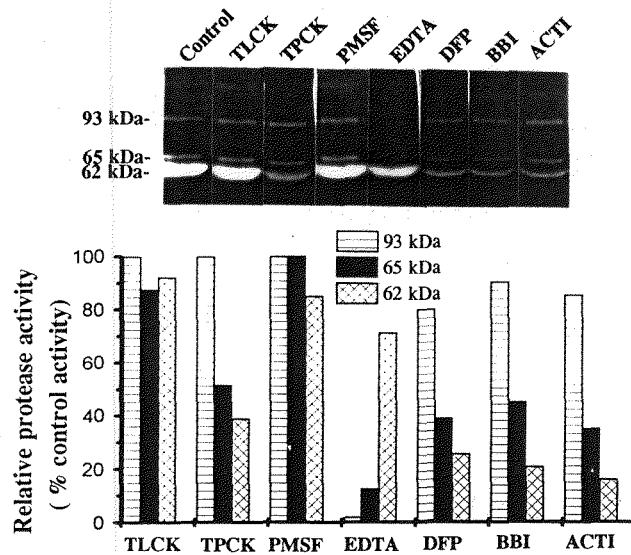


圖十三、Optimal pH 值的測定

利用各種不同 pH 值的緩衝液，分析 93、65、62 kDa 蛋白酶活性的 pH 值範圍

上圖：電泳的結果

下圖：將電泳的結果利用 AlphaImager 2000, 測每個蛋白酶的活性值。計算的方式以 93 kDa 蛋白酶為例：取其中最高的活性值當作 100%，而剩下的不同 pH 值的活性值再與之計算相對的百分比，如：不同 pH 值的活性值/最高的活性值 X 100%



圖十四、蛋白酶抑制抑制 93、65、62 kDa 蛋白酶活性的分析

可以了解 93、65、62 kDa 蛋白酶是屬於那一類蛋白酶
S180(soft)細胞之研磨液先進行電泳後，再分別加入不同的
蛋白酶抑制反應。上圖：電泳的結果；下圖：電泳的結果利用
AlphaImager 2000,測定每個蛋白酶被抑制後的活性值。計算的方式以
93 kDa 蛋白酶為例：以 control 的 93 kDa 蛋白酶活性值為 100%，如：
TLCK 抑制後的 93 kDa 蛋白酶活性值/ control 的 93 kDa 蛋白酶活性值
X 100 %

5 mM DFP、PMSF：屬 serine protease inhibitor

4 mM TLCK：為 trypsin inhibitor；4 mM TPCK：為 chymotrypsin

inhibitor；20 mM EDTA：屬 metalloprotease inhibitor；350 μg DLTI：

屬 Bowman-Birk inhibitor (BBI)；350 μg ACTI：屬 Kunitz family
inhibitor

1. Correa , P. (1981) Epidemiological correlations between diet and cancer frequency. *Cancer Res.* 41, 3685-3690.
2. Fontham ,E. and Correa ,P. (1993) in Protease Inhibitors as Cancer Chemopreventive Agents (Troll ,W., and Kennedy, A.R.Eda), pp.1-8, Plenum Press,New York.
3. Birk, Y.(1975) Protease inhibitors from plant sources. *Methods Enzymol.* 45, 695-751.
4. Kennedy, A. R. (1993) in Protease Inhibitors as Cancer Chemopreventive Agents (Troll, W., and Kennedy, A. R. Eds), pp.9-91, Plenum Press, New York.
5. Wattenberg, L. W. (1985) Chemoprevention of cancer. *Cancer Res.* 45, 1-8.
6. Carp, H., and Janoff, A. (1978) Possible mechanisms of emphysema in smokers. In vitro suppression of serum elastase-inhibitory capacity by fresh cigarette smoke and its prevention by antioxidants. *Am. Rev. Respir. Dis.* 118, 617-621.
7. Janoff, A., Carp, H., Lee, D. K., and Drew, R. T. (1979) Cigarette smoke inhalation decreases α 1-antitrypsin activity in rat lung. *Science* 206, 1313-1314.
8. Little, J. B. (1977) Radiation carcinogenesis in vitro: implications for mechanisms. Cold Spring Harbor Conf. Cell Proliferation. 4, 923-939.
9. Clark, R. A., Stone, P. J., Hag, A. E., Calore, J. D., and Frazblau, C. (1981) Myeloperoxidase-catalyzed inactivation of α 1 protease inhibitor by human neutrophils. *J. Biol. Chem.* 256, 3348-3353.
10. Goldstein, B. D., Witz, G., Amoruso, M., Stone, D. S., and Troll, W. (1981)

Stimulation of human polymorphonuclear leukocyte superoxide anion radical production by tumor promoters. *Cancer Lett.* 11, 257-262.

11. Goldstein, B. D., Witz, G., Amoruso, M., and Troll, W. (1979) Protease inhibitors antagonize the activation of polymorphonuclear leukocyte oxygen consumption. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 88, 854-860.
12. Witz, G., Goldstein, B. D., Amoruso, M., Stone, D. S., and Troll, W. (1980) Retinoid inhibitor of superoxide anion radical production by human polymorphonuclear leukocytes stimulated with tumor promoters. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 97, 883-888.
13. Corasanti, J. G., Hobika, G. H., and Markus, G. (1982) Interference with dimethylhydrazine induction of colon tumors in mice by ϵ -aminocaproic acid. *Science* .216, 1020-1021.
14. Kennedy, A. R. (1993) Overview: anticarcinogenic activity of protease inhibitors. In: W. Troll and A. R. Kennedy (eds.). Protease inhibitors as cancer chemopreventive agents. pp. 9-64. New York: Plenum Publishing Corp.
15. Yavelow, J., Finlay, T. H., Kennedy, A. R., and Troll, W. (1983) Bowman-Birk soybean protease inhibitor as an anticarcinogen. *Cancer Res.* 43, 2454-2459.
16. Hirayama, T. (1982) Relationship of soybean paste soup intake to gastric cancer risk. *Nutr. Cancer.* 3, 223-233.
17. Kennedy, A. R. (1994) Prevention of carcinogenesis by protease inhibitors. *Cancer Res* 54, 1999-2005.
18. Heldin, C. H., and Westermark, B. (1984) Growth factors: mechanism of action and reation to oncogenes. *Cell.* 37,9-20.

19. Loh, Y. P., and Gainer, H. (1985) in *Brain Peptides*, eds. Krieger, O.T., Brownstein, M. J., and Martin, J. B. (Wiley, New York) pp. 80-116.
20. Kennedy, A. R. (1984) in *Vitamins, Nutrition and Cancer*, ed. Prasad, K. N. (Karger, Basel) pp. 166-179.
21. Fontham, E. and Correa, P. (1993) in *Protease inhibitors as cancer chemopreventive agents* (Troll, W., and Kennedy, A. R. Eds.) , pp. 1-8, Plenum Press, New York.
22. Kennedy, A. R. (1985) The conditions for the modification of radiation transformation in vitro by a tumor promoter and protease inhibitors. *Carcinogenesis* .6, 1441-1445.
23. St. Clair, W. H. (1991) Suppression of 3-methylcholanthrene-induced cellular transformation by timed administration of the Bowman-Birk protease inhibitor. *Carcinogenesis*. 12, 935-937.
24. Laskowski, M., Jr., and Kato, I. (1980) Protein inhibitors of proteinases. *Annu. Rev. Biochem.* 49, 593-626.
25. Madar, Z., Gertler, A., and Birk, Y. (1979) *Comp. Biochem. Physiol. A* 62, 1057-1061.
26. Liener, I. (1979) Significance for humans of biologically active factors in soybeans and other food legumes. *J. Am. Oil Chemists` Soc.* 56, 121-129.
27. Yavelow, J., Collins, M. F., Birk, Y., Troll, W., and Kennedy, A. R. (1985) Nanomolar concentrations of Bowman-Birk soybean protease inhibitor suppress x-ray-induced transformation in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82, 5395-5399.
28. Weed, H., McGandy, R. B., and Kennedy, A. R. (1985) Protection against

- dimethylhydrazine-induced adenomatous tumors of the mouse colon by the dietary addition of an extract of soybeans containing the Bowman-Birk protease inhibitor. *Carcinogenesis*. 6, 1239-1241.
29. Messadi, D. V., Billings, P., Shklar, G., and Kennedy, A. R. (1986) Inhibition of oral carcinogenesis by a protease inhibitor. *J. Natl. Cancer Inst.* 76, 447-452.
 30. Baturay, N. Z., and Kennedy, A. R. (1986) Pyrene acts as a cocarcinogen with the carcinogens benzo [a] pyrene, beta-propiolactone and radiation in the induction of malignant transformation in cultured mouse fibroblasts; soybean extract containing the Bowman-Birk inhibitor acts as an anticarcinogen. *Cell Biol. Toxicol.* 2, 21-32.
 31. Kennedy, A. R., Radner, B., and Nagasawa, H. (1984) Protease inhibitors reduce the frequency of spontaneous chromosome abnormalities in cells from patients with Bloom syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* .81, 1827-1830.
 32. Friedberg, E. C., Ehmman, U. K., and Williams, J. I. (1979) Human disease associated with defective DNA repair. in: J. T. Lett and Asler (eds.) *Advances in Radiation Biology*. 8, pp. 85-174. New York Academic Press.
 33. Kuroki, T., and Drevon, C. (1979) Inhibitor of chemical transformation in C3H/10T_{1/2} cells by protease inhibitors. *Cancer Res.* 39, 2755-2761.
 34. Witschi, H., and Kennedy, A. R. (1989) Modulation of lung tumor development in mice with the soybean-derived Bowman-Birk protease inhibitor. *Carcinogenesis*. 10, 2275-2277.
 35. Billings, P. C., Newberne, P. W., and Kennedy, A. R. (1990) Protease inhibitor suppression of colon and gland carcinogenesis induced by dimethylhydrazine. *Carcinogenesis*. 11, 1083-1086.

36. St. Clair, W. H., Billings, P. C., Carew, J. A., Kellew, McGandy, C., Newberne, P., and Kennedy, A. R. (1990) Suppression of dimethylhydrazine-induced carcinogenesis in mice by dietary addition of the Bowman-Birk protease inhibitor. *Cancer Res.* 50, 580-586.
37. Weed, H., McGandy, R. B., and Kennedy, A. R. (1985) Protection against dimethylhydrazine-induced adenomatous tumors of the mouse colon by the dietary addition of an extract of soybeans containing the Bowman-Birk protease inhibitor. *Carcinogenesis.* 6, 1239- 1241.
38. Kennedy, A. R. and Billings, P. C. (1987) Anticarcinogenic action of protease inhibitors. In Cerutti, P. A., Nygaard, A. F. and Simic, M. G. (eds). Proceedings of the 2nd International Conference on Anticarcinogenesis and Radiation Protection. Plenum Press. New York. pp. 285-295.
39. Billings, P. C., Carew, J. A., Keller-McGandy, C. E., Goldberg, A. I., and Kennedy, A. R. (1987) A serine protease activity in C3H/10T1/2 cells that is inhibited by anticarcinogenic protease inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 34, 4801-4805.
40. Yavelow, J., Scott, C. B., and Mayer, T. C. (1987) Fluorescent visualization of binding and internalization of the anticarcinogenic Bowman-Birk type protease inhibitors in transformed fibroblasts. *Cancer Res.* 47, 1602-1607.
41. Bond, J. S., and Butler, P. E. (1987) Intracellular proteases. *Ann. Rev. Biochem.* 56, 333-364.

第三部份：

大葉合歡胰蛋白酶抑制劑 cDNA 的選殖、定序和其初級結構分析

Nucleotide sequence of cDNA for *Albizza lebbek* trypsin inhibitor and its deduced primary structure

中山醫學院生物化學研究所

指導教授：謝易修 博士(Yih-Shou Hsieh, Ph.D.)

研究生：林麗娟 (Li-Jen Lin)

中文摘要

大葉合歡胰蛋白酶抑制劑(ALT1)由 A 鏈及 B 鏈以可能是一對硫鍵連結所組成(因為有四個 cysteine)，A 鏈含 135 個胺基酸，B 鏈含 40 個胺基酸，分子量共 21,000 Daltons，屬於 Kunitz-type 的抑制劑。合成可能的大葉合歡胰蛋白酶抑制劑 A 鏈的胺端和 B 鏈的羧端胺基酸的 oligonucleotide 當作 primers，萃取尚未成熟種子的 cDNA 當作模板，利用 PCR 的技術，選殖了 ALT1 的 cDNA 序列。ALT1 cDNA 全長 525 bp 轉譯成 175 個胺基酸，結果發現和蛋白序列相同，並且推論在 ALT1 胺基酸序列中的 Asn¹³⁵ - Ser¹³⁶ 藉由一特異的蛋白酶進行 post-translation processing 在兩者間進行 cleavage 而產生 A 鏈和 B 鏈。此種 post-translation processing 的方式不同於先前已知產生兩條肽鏈的方式。將 ALT1 和其它 Kunitz-type 的胰蛋白酶抑制劑胺基酸序列相比較，發現和 ACT1 的胺基酸序列有 89.1% 的相似性，在核苷酸序列上則有 91.6% 的相似性。這似乎意味著植物中的 *Albizzia* (合歡)和 *Acacia* genus (相思樹)有著演化上的關係。

英文摘要

To facilitate the cloning and sequence determination of *Albizzia lebbek* trypsin inhibitor, total cDNA mixture was constructed from the poly(A)⁺ mRNA of maturing *Albizzia lebbek* seeds. Synthetic oligonucleotides corresponding to all possible sequences of N-terminal and C-terminal region of *Albizzia lebbek* trypsin inhibitor (ALTI) were used to amplify ALTI-related sequences by the polymerase chain reaction. PCR-amplified product corresponding to ALTI was obtained, which was then subcloned into T-vector and then transformed into *E. coli* strain JM109. Plasmids purified from the positive clones were prepared for nucleotide sequencing by Sanger method. Sequencing several clones containing DNA inserts coding for ALTI constructed a complete full-length of 525 base pairs covering a deduced protein sequence of 175 amino acids. In the analysis of ALTI-cDNA sequence, the ALTI show 89.1 % identity in amino acid sequence and 91.6 % identity in nucleotide sequence as compared with trypsin inhibitor of *Acacia confusa* (ACTI). The cleavage site of site of subunit in ALTI is different from the ACTI cleavage site. The unique subunit architecture of ALTI indicates the presence of new post-translational processing. Comparison of deduced amino acid sequence of ALTI with the sequence of others protease inhibitors from Leguminosae, underlying the remote evolutionary relationship between *Albizzia* and *Acacia* genus of plant.

緒 言

根據流行病學的研究，吃素的族群具有高豆類和穀類的消耗，而他們相對罹患乳癌、直腸癌和攝護腺癌的比例較一般人為低^(1,2,3)。更進一步的研究指出玉米 (maize)、穀類 (corn) 和豆科植物的豆子 (beans) 可以預防癌症。而絕大多數豆科植物其種子內富含蛋白脢抑制劑⁽⁴⁾。除植物外，在動物界如血液、精液、胰臟以及微生物界，如酵母菌^(5,6)、鏈黴菌屬 (*Streptomyces*)⁽⁷⁾、*Aspergillus sojae*⁽¹²⁾ 中亦有蛋白脢抑制劑的存在。

在正常的動物體內蛋白脢抑制劑和蛋白脢是以一種平衡的狀態存在，共同維持體內正常的運作。在許多研究報告中指出，癌細胞的產生、侵襲、轉移與蛋白脢的活性和表現量的提高有很大的關係^(8,9)，此外蛋白脢還有可使細胞失去接觸性生長 (contact inhibitor) 的性質^(10,11)，而使癌細胞毫無限制的生長，甚至發生重疊 (pile up) 現象；並且由於蛋白脢在細胞表面上的作用，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也會增加，使得親醣蛋白對其之凝集活性增加，然而外加蛋白脢抑制劑或誘發內生性蛋白脢抑制劑可以改善這些異常的現象。

最近醫藥學方面，也期望這些蛋白脢抑制劑可對某些疾病的治療有所幫助，曾嘗試用於治療休克、胰臟炎、過敏反應及發炎現象⁽¹²⁾。目前市面上發售的「Foy」，即是利用胰蛋白脢抑制劑 (trypsin inhibitor) 做成的藥劑。

至於蛋白脢抑制劑在動、植物的生理意義為何，直到目前仍不十分清楚，不過一般相信，脊椎動物胰臟存在的胰蛋白脢抑制劑可阻止胰蛋白脢原及胰臟其它酵素原的過早活化，而哺乳類動物血液中，蛋白脢抑制劑可參予凝血作用，纖維蛋白分解，補體之活化及發炎反應

(13)。植物內的蛋白酶抑制劑含量與收成時間、新鮮度及品種的差異有明顯的相關性，在各種組織器官內抑制劑的分佈量亦隨生理發展而改變⁽¹⁴⁾，如種子內含量多，但發芽時則會漸漸地減少，目前只能推測蛋白酶抑制劑的存在或許是一種蛋白質儲存的方式，也或許是保護植物本身以對抗昆蟲與微生物的侵襲^(15,16)，亦有可能具有調節植物本身酵素活性與代謝的功能。

1938年，Read和Hass發現大豆萃取液中，含有抑制蛋白酶消化動物膠 (gelatin) 的成份，為最早證實植物中含有蛋白酶抑制劑⁽¹⁷⁾。1944年Hass等人將該成份部份純化，並證實其為一種蛋白質⁽¹⁸⁾。至1946年，Kunitz發現Kunitz soybean trypsin inhibitor並析出結晶⁽¹⁹⁾，是為近代研究蛋白酶抑制劑之里程碑。

早期研究蛋白酶抑制劑主要是由營養學之觀點著眼^(20,21,22,23,24)，因為許多是作為食物的植物，如大豆、大麥、馬鈴薯、蠶豆等，都含有胰蛋白酶抑制劑，若以未煮熟之大豆餵食雞或老鼠，可觀察到其生長受到抑制，胰臟腫大^(25,26,27)，於是Liener等人提出假說來說明蛋白酶抑制劑在營養學上所扮演的角色，並嘗試利用適當的加熱處理，去除蛋白酶抑制劑的作用，以提高植物性食物的營養價值。在工業界已成功達到此一目的。

同時生化學家也致力於蛋白酶抑制劑的理化性質研究，因蛋白酶抑制劑本身為一蛋白質，對蛋白酶有高度親和性，希望可以藉由研究蛋白酶抑制劑與蛋白酶的交互作用，進而了解蛋白與蛋白間的作用方式。

自然界存在的蛋白酶可依其活性位置及作用方式分為：1. 絲胺酸型蛋白酶 (serine)：如胰蛋白酶，凝乳酶；2. 硫醇型蛋白酶 (cysteine or thiol)：如木瓜酶；3. 金屬型蛋白酶 (metalloproteinase)：如carboxypeptidase A及B，aminopeptidase；4. 酸性型蛋白酶

(aspartic or acid)：如胃蛋白酶。同時自然界中此四種蛋白酶抑制劑均存在，其專一性各不相同，有些只能抑制一種或兩種蛋白酶，有些則可抑制兩種以上的蛋白酶^(28,29)。而這些可抑制兩種或兩種以上的蛋白酶抑制劑又可分為兩種：1. 雙頭型 (double headed)：如賴馬豆(lima bean)，可同時抑制胰蛋白酶和凝乳酶，但抑制兩者的活性位置不同；2. 單頭型 (single headed)：即抑制數種功能均由同一個活性位置 (active site)負責，如馬鈴薯之IIa 與IIb 抑制劑^(12,30,31,32)。

Laskowski 將蛋白酶抑制劑依分子大小分成三類：1. 小肽鏈：如由細菌分離的 leupeptin，antipain⁽³³⁾；2. 小分子蛋白酶抑制劑：如胰臟蛋白酶抑制劑⁽³⁴⁾；3. 大分子蛋白酶抑制劑：如人體血液內的 α 2-Macroglobulin⁽³⁵⁾。而胰蛋白酶抑制劑又可依其活性有關的胺基酸分為：離胺酸型與精胺酸型兩類⁽³⁶⁾，然不屬於此兩類者亦陸續被發現，如 Schiessler 自人類精液中分離出一種胰蛋白酶抑制劑⁽³⁷⁾。

小分子蛋白酶抑制劑因其分子量不高，有些一級結構已被決定出^(30,50,42,51,52)，而由這些胺基酸的排列找出共同的序列⁽³⁸⁾，使植物的分類與演化能做深入的比較，如 Richardson⁽³⁹⁾曾由四種豆科植物的胰蛋白酶抑制劑中，發現它們的胺基酸排列非常相似。而 Ryan⁽⁴⁰⁾等人則發現馬鈴薯內兩種不同型的蛋白酶抑制劑，即凝乳酶抑制劑(屬絲胺酸型蛋白酶抑制劑)與 carboxypeptidase 抑制劑(屬金屬型蛋白酶抑制劑)，此兩者有許多類似的胺基酸序列，顯然由同一基因演化而來。

Laskowski⁽⁴¹⁾等人曾將大豆中屬於 Kunitz family 抑制劑活性的位置，利用水解酶及化學合成法以色胺酸取代精胺酸-63，結果該色胺酸-63 的抑制劑仍可強烈抑制凝乳酶，但卻失去了胰蛋白酶的抑制活性。由 Laskowski 之實驗及基因密碼 (codon)看來，自然界有可能發生如此的突變，只因一個 base 的改變而由精胺酸密碼(CGG)變成色胺酸密碼(UGG)。

此外 Tan 與 Stevens⁽⁴²⁾發現蛋白酶抑制劑的一級構造內有序列重複的現象，可能是由於基因複製的結果⁽³⁹⁾，又抑制劑的活性位置往往位於此種重複序列內，極可能雙頭型或多頭型抑制劑乃是因此而產生。而 Laskowski 與 Sealock 也曾研究多種蛋白酶抑制劑的活性位置⁽⁴³⁾，發現蛋白酶抑制劑的活性位置均位於雙硫鍵所形成的環狀構造內。

胰蛋白酶抑制劑廣泛存在豆科植物中，如 *mimosoidea*，*caesalpinioideae* 和 *lotioideae* (*papilionoideae*)^(53,54)，而由植物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兩類：1. Bowman-Birk inhibitor family：分子量較小，約 8,000 至 10,000 daltons 含有很高的半胱胺酸，每 100 個胺基酸中即含 20 個半胱胺酸，大多數的胰蛋白酶抑制劑是屬於此型；2. Kunitz inhibitor family：以 soybean trypsin inhibitor 為代表，此型的 inhibitors 較少，分子量約 20,000 daltons，半胱胺酸的量很低，每 100 個胺基酸中只含 4 個半胱胺酸。

許多蛋白或胜肽在生物體內都是以前驅物分子存在，需要經蛋白酶作 post-translation processing 才能得到完全的生物活性，例如 insulin、parathyroid hormona 和 opiomelanocortin^(45,46,47)。通常前驅物的活性低於經過 post-translation processing 的蛋白或胜肽。例如 diphtheria toxin、ricin 或 abrin 也都需要經過 post-translation processing 變成具有二個胜肽鏈、有活性的蛋白^(44,48,49)。大多數的胰蛋白酶抑制劑都是以單一胜肽鏈存在就已有生物活性，然而具有二個鏈的胰蛋白酶抑制劑已經從 silk tree seed (*Albizzia julibrissin*)⁽⁵⁶⁾、*Acacia elata*⁽⁴⁴⁾ 和 *Acacia confusa*⁽⁵⁵⁾ 分離出。

本文所用的實驗材料大葉合歡(*Albizzia lebbek*)，為大喬木，葉總柄光滑或有軟毛，近基部及先端各有一大腺，羽片 4 至 10 對，小葉 6

至 8 對，長 3 至 5 公分，寬約 1.5 公分，歪橢圓形，花淡綠黃色，腋生，總梗短而生多數頭狀花。莢果薄長約 30 公分，寬約 3 公分，原產緬甸。現在分佈在台灣的山區，作為木材和木炭的來源。

由大葉合歡種子所分離的胰蛋白酶抑制劑 (*Albizzia lebbek* trypsin inhibitor)，簡稱 ALTI，是由不同肽的 A 鏈及 B 鏈以雙硫鍵連結所組成的蛋白，A 鏈含 136 個胺基酸，B 鏈含 40 個胺基酸，分子量 21,000 Daltons，有四個 cysteine 是屬於 Kunitz-type 的抑制劑 (44)。

基於在治療與預防癌症的領域中，蛋白酶抑制劑具有 chemoprevention 的潛能，同時也可藉由蛋白酶抑制劑能有效抑制細胞的 transformation 和腫瘤細胞的生長，來探討正常細胞轉變成癌細胞的過程以及癌細胞的發展中的分子機制。而且再加上初步的 ALTI 胺基酸的分析，得知與 ACTI (*Acacia confusa* trypsin inhibitor) 的相似性很高，而 ACTI 具有抗癌活性，可以抑制 sarcoma 180 細胞的生長，故欲進一步探討 ALTI cDNA 與 ACTI cDNA 構造上的相異性。

縮 寫

ALTI	: <i>Albizzia lebbek</i> trypsin inhibitor
bp	: Base pair(s)
dNTP	: Deoxyribonucleotide triphosphate
DTT	: Dithiothreitol
IPTG	: Isopropyl-D-thiogalactopyranoside
X-gal	: 5-Bromo-4-chloro-indolyl- β -D-galactoside
kb	: Kilobase(s) or 1000 bp
nt	: Nucleotide (s)
PCR	: Polymerase chain reaction
EDTA	: Ethylene diamine tetraacetic acid
SDS	: Sodium dodecyl sulfate
TEMED	: N,N,N',N'-Tetramethylene diamine
Tris	: Tris (hydroxymethyl)-aminomethane



實驗材料

1. 大葉合歡 (*Albizzia lebbek*)種子，本省出產
2. RNasin、DNA purification systems、T₄ DNA ligase：購自 Promega 公司
3. Restriction enzyme (*EcoR* I)：購自 Biolabs 公司
4. Taq DNA polymerase：購自 DynaZyme™II公司
5. RNA isolation kit：購自 MBI 公司
6. Poly(A)Quick kit：購自 Stratagene 公司
7. TA cloning vector：購自 Invitrogen 公司
8. M-MLV reverse transcriptase：購自 Gibco BRL 公司
9. DNA sequencing kit：購自 United States Biochemical 公司
10. dNTP、IPTG、Ampicillin、X-gal、Acrylamide、N,N'-methylene-bis-acrylamide：購自 Sigma 公司
11. agarose：購自 Difco laboratories detroit michigna USA
12. 尿素、氯仿：購自 MERCK 公司
13. 醋酸：購自皓峰企業股份公司
14. SDS：購自美國 Serva 公司
15. Tris：購自德國 E. Merck 公司
16. TEMED：購自 Bio-Rad 公司
17. 儀器
 - IBI Base Runner™ 100
 - PCR：Gene E
 - Beckman GS-6R Centrifuge
 - Power supply：Stratagene Feather Valt™ 2000

實驗方法

1. Poly (A)⁺ RNA 的分離

大葉合歡種子 total RNA 之抽取

A.

- 1) 摘取新鮮 ALTI 種子 70-80 g 和 liquid nitrogen 一起置於研鉢中，並且立即研磨成粉狀，再加入 50 ml extraction buffer 及 50 μ l DEPC (最後濃度 0.1%)，繼續研磨並靜置 10 分鐘
- 2) 分裝至已滅菌之離心管並加入等體積之 acid phenol : chloroform (1:1)，劇烈震盪 (vortex)
- 3) 於 4 °C 下，離心 12,000 rpm (Beckman JA-21 rotor) 10 分鐘
- 4) 取上清液再加入等體積之 acid phenol : chloroform (1:1)，vortex
- 5) 於 4 °C，離心 12000 rpm (Beckman JA-17 rotor) 15 分鐘
- 6) 取上清液再加入等體積之 chloroform，vortex，再重複步驟 5、6 一次
- 7) 取上清液再加入等體積之冰冷 isopropanol，輕輕混和後，冰上靜置 10 分鐘，於 4 °C 下離心 12,000 rpm 30 分鐘，取沈澱並且真空抽乾

Extraction buffer 配製如下：

7M urea，1 M NaCl，50 mM Tris-HCl, pH 8.0，20 mM EDTA，1% sarcosine

B. 以 MBI RNA isolation kit 進一步純化 RNA

- 1) 加入 1 ml RS1 和 1 ml chloroform，混和均勻 (mix)，再加入 0.3 ml cold RS2，vortex
- 2) 冰上靜置 5 分鐘後，於 4 °C 下離心 12,000 rpm (Beckman, JA-21

rotor)10 分鐘

- 3) 將上清液轉移到 eppendorf tube，並且加入 1.3 ml ice-cold isopropanol，mix
- 4) 於 4 °C 下，離心 12,000 rpm (Eppendorf, model 5415C)15 分鐘，倒掉上清液，沈澱物用 75 % 酒精 wash
- 5) 倒掉上清液，沈澱物用真空抽乾，加入 460 µl DEPC-treated H₂O 溶解沈澱物
- 6) 於 60 °C 水浴中加熱 15 分鐘後 vortex 30 秒，置於冰上進一步純化 mRNA

以 Poly (A) Quilick kit 純化大葉合歡 mRNA 的抽取

- 1) 將 B 獲得之 RNA sample 置於冰上並且加入 10X sample buffer (最後濃度為 1X)
- 2) elution buffer 先置於 65 °C 水浴中預熱
- 3) 將 push column 的兩個頭拔掉，以 10 cc 針筒將 push column 內水份排掉 (流速 1 drop / 2 sec)
- 4) 取 200µl high-salt buffer 注入 push column，再用 10 cc 針筒將 push column 內 high-salt buffer 流掉(流速 1 drop / 2 sec)，重複此步驟一次
- 5) 取步驟 1 的 solution 注入 push column 內，再用 10 cc 針筒將 push column 內 solution 流掉(流速 1 drop / 2 sec)，重複步驟 4 二次
- 6) 取 200µl low-salt buffer 注入 push column 內，再用 10 cc 針筒將 push column 內 low-salt buffer 流掉(流速 1 drop / sec)，重複此步驟三次
- 7) 取 200µl elution buffer 注入 push column 內，再用 10 cc 針筒將 push column 內 elution buffer 流出並且收集 (流速 1 drop / sec)，重複此步驟三次
- 8) 取收集的濾液以 spectrophotometer 測 260 nm 和 280 nm 比率來換

算 mRNA 的濃度 (10.D.260 = 40 $\mu\text{g/ml}$ ssRNA)和純度

- 9) 取 650 μl 濾液加入等體積的 isopropanol , mix 後離心 12,000 rpm 5 分鐘
- 10) 取沈澱物並且真空抽乾
- 11) 乾燥的沈澱物加入 46 μl DEPC-treated H_2O 並且在 65 $^\circ\text{C}$ 水浴中加熱溶解

2. 第一股 cDNA 的合成

- 1) 取 5 μg mRNA (23 μl) 加入 10 μl 5X first strain buffer , 再加入 5 μl 2.5 mM dNTPs
- 2) 加入 10 μl 1 O.D./100 μl oligo dT₁₅ primer , 在 90 $^\circ\text{C}$ 下加熱 5 分鐘
- 3) 加入 1 μl 40 U/ μl rRNasin , 再加入 1 μl 200 U/ μl M-MLV reverse transcriptase
- 4) 在 37 $^\circ\text{C}$ 下反應 1 hr , 再於 95 $^\circ\text{C}$ 下加熱 5 分鐘
- 5) 加入等體積的鹼性 phenol: chloroform (1:1) , mix 之後離心 12,000 rpm 5 分鐘
- 6) 取上清液加入兩倍體積預冷的 95 % 酒精並且在 0 $^\circ\text{C}$ 下靜置 10 分鐘 , 再放入 -20 $^\circ\text{C}$ 10 分鐘
- 7) 於 4 $^\circ\text{C}$ 下離心 12,000 rpm 5 分鐘 , 沈澱物以 75 % 酒精 wash 二次 , 真空抽乾 , 取乾燥的沈澱物加入 50 μl $\text{d}_2\text{H}_2\text{O}$

3. 聚合酶鏈反應 (polymerase chain reaction)

- 1) 取 0.5 μg cDNA 加入 10 μl 10X Taq buffer (Prizyme) , 8 μl 2.5 mM dNTP 2 μl 100 pmole / 2 μl mix primer A , 2 μl 100 pmole / 2 μl mix primer B , 0.4 μl 5U / μl Taq polymerase (Prizyme) , 最後加水至 50 μl , mix 後加入兩滴的礦油

2) 進行 PCR (thermocycler) protocol :

1. 94 °C , 4 mins

2. 94 °C , 1min → 45 °C , 2 mins → 70 °C , 3 mins 35 cycles

3. 70 °C , 7 mins

3) 取 10 µl product 進行 2.5 % agarose gel electrophoresis 分析
(於 1X Tris borate buffer , pH8.0)

1X Tris borate buffer : 0.09M Tris-borate , 0.002 M EDTA

4. 以 PCRapid™ purification kit (Bioline) 純化 PCR 產物

1) 取全部 PCR product 至 1.5 ml eppendrof , 加入 150 µl PCRapid™ immobilizer suspension (使用前需劇烈震盪) , vortex 並且在冰上靜置 3 分鐘

2) 離心於 4 °C 下 spin down

3) 倒掉上清液並且加入 1 ml wash buffer , vortex 之後 spin down

4) 重複步驟 3 二次之後 , 以用 tip 抽乾剩餘的液體

5) 沈澱物加入 60 µl elution buffer , vortex 之後在 52 °C 水浴下反應 5 分鐘

6) 於 4 °C 下離心 12,000 rpm 5 分鐘 , 取上清液至另一 eppendrof 以進行 PCR 反應

5. 第二次聚合酶鏈反應 (polymerase chain reaction)

1) cocktail mixture 同上次 PCR

2) 進行 PCR (thermocycler) protocol :

1. 94 °C , 4 mins

2. 94 °C , 1min →45 °C , 2 mins →72 °C , 3 mins 35 cycles
3. 72 °C , 7 mins
- 3) 反應結束後取 10µl product 進行 2.5 % agarose gel electrophoresis 分析(於 1X Tris borate buffer pH8.0)

6. 第二次 PCR 產物以 PCRapid™ purification kit 純化
同上次

7. PCR 產物的接合反應

- 1) 取純化的 PCR 產物與 TA cloning vector 以 cDNA : TA cloning vector = 3 : 1 的量
- 2) 加入 1µl ligase , 1µl 10X ligation buffer , 加入二次蒸餾水至總體積 10µl
- 3) 在 16 °C 下反應 16 小時

8. 轉形作用 (transformation)

(1) 勝任菌體 (competent bacterial cells)之備製

- 1) 培養單一菌落大腸桿菌 JM109 , 於 5 ml LB 培養液中 O/N
- 2) 第二天取步驟 1 的 100 µl 培養液至另一新的 5 ml LB 培養液中 , 在 37 °C 下培養 2-3 小時 , 取菌液於 4 °C 下離心 8,000 rpm (Beckman , JA-14 rotor) 5 分鐘

以下步驟需在無菌室內操作

- 3) 菌體加入 2 ml transform buffer , mix 之後於 4 °C 下離心 8,000 rpm 5 分鐘
- 4) 菌體加入 1 ml transform buffer , mix 之後置於冰上 1-2 小時 , 分裝菌液 (200 µl 菌液/ 1.5 ml eppendorf) 並且置於 -75 °C 下備用

Transform buffer (需要滅菌) :

10 mM mops (morpholinopropanesulfonic acid) , 100 mM CaCl₂ ,
30 mM D-glucose , 15% glycerol , 2 mM NaOH

(2) 轉形作用之步驟

- 1) 取 200 μ l JM109 加入 10 μ l ligation solution (接合 DNA) , mix 後置於冰上 30 分鐘 , 再在 42 °C 水浴中進行 heat shock 3 分鐘
- 2) 加入 500 μ l LB 培養液 , 在 37 °C 下培養 30 分鐘
- 3) 取各種不同體積之培養液 (250 , 200 , 150 μ l) 至 eppendrof 中 , 分別加入 20 μ l IPTG (100 mM) 和 10 μ l 10% X-gal (溶於 N,N,dimethylformamide) , mix 後塗抹至 LB+Ap agar plate (每毫升含 50 μ l 的 ampicillin)
- 4) 置於 37 °C 培養箱培養 O/N
- 5) 第二天挑選白色菌落 (白色菌落表示 vector 以嵌入 DNA) 於 5 ml LB+Ap 培養液中 , 37 °C 震盪培養過夜

9. 質體 DNA 的微量抽取

- 1) 取 5 ml 震盪培養過夜的菌液 \rightarrow 於 4 °C 下離心 3,000 rpm 10 分鐘
- 2) 沈澱物加入 200 μ l solution I 懸浮菌體 , 再加入 200 μ l solution II
- 3) 加入 200 μ l solution III , 冰上靜置 5 分鐘後離心 12000 rpm 5 分鐘
- 4) 取上清液加入 5 μ l 5 mg/ml RNase 在 37 °C 反應 60 分鐘
- 5) 加入等體積的 phenol , 於 4 °C 下離心 12,000 rpm 3 分鐘
- 6) 上清液加入等體積的 phenol : chloroform (1 : 1) , 同步驟 5 vortex , 離心 , twice
- 7) 取上清液加入等體積的 chloroform , 同步驟 5 vortex , 離心
- 8) 取上清液加入 1/10 倍體積的 3 M sodium acetate, pH 5.2 和 2.5 倍體積的 95 % 酒精 , mix 後置於 -75 °C 15 分鐘

- 9) 於 4 °C 下離心 12,000 rpm 10 分鐘，取沈澱物用 1 ml 70% cold 酒精 wash
- 10) 倒掉上清液並且用真空抽氣 5 分鐘，抽乾的 DNA 加入 50 ul ddH₂O 溶解
- 11) 取 8 μl DNA 加入 1μl EcoRI (20 unit/μl)，3 μl EcoRI 10 X buffer 和 18μl ddH₂O
- 12) 在 37 °C 下反應 3 小時，取 10 μl 進行 0.8 % agarose gel 電泳分析

Solution I : 50 mM glucose , 25 mM Tris-HCl, pH 8.0

Solution II : 0.2 N NaOH , 1% SDS

Solution III : 5M sodium acetate , 2N glacial acetic acid

10 .DNA 定序法

本實驗進行的 DNA 定序採用 Sanger 所發展出來的酵素法 (dideoxyribonucleotide chain termination sequencing)，直接利用雙股 DNA 當模板 (template) 進行其中「嵌接 DNA」的定序實驗。

(1) 雙股質體的純化 (DNA purification systems)

- 1) 取 5 ml 菌液(已震盪培養過夜)，於 4 °C 下離心 3,000 rpm 10 分鐘
- 2) 沈澱物加入 200 μl resuspension solution，懸浮菌液再加入 200 μl cell lysis solution，mix 後再加入 200 μl neutralization solution
- 3) 離心 12,000 rpm 5 分鐘，取上清液加 600μl resin，靜置 1 min
- 4) 全部 solution 倒入 10 cc 針筒(已接上 mini-column)，將液體流掉
- 5) 再加入 2 ml column wash solution 於 10 cc 針筒(已接上 mini-column)，再將液體流掉
- 6) mini-column 放在 eppendorf tube 上,於 4 °C 下離心 12,000 rpm 20 秒

- 7) mini-column 再放在 new eppendorf tube 上並且加入 50 μ l pre-warm 50 $^{\circ}$ C ddH₂O, 靜置 1 分鐘後於 4 $^{\circ}$ C 下離心 12,000 rpm 30 秒
- 8) 取 1 μ l 進行 0.8% agarose gel 電泳分析

(2) DNA 序列反應

本實驗室採用 USB 之 sequencing kit, Version 2.0, 作法如下

A. 質體 DNA 的變性 (denature double strand DNA)

- 1) 取 3-4 μ g (約 6 μ l) double strand DNA 加入 12 μ l ddH₂O, 再加入 2 μ l 鹼性溶液 (2N NaOH, 2mM EDTA) 並且在室溫下反應 5 分鐘
- 2) 加入 2 μ l 2M ammonium acetate, pH 4.6, 75 μ l 95% 酒精, vortex 後放入 -75 $^{\circ}$ C 10 分鐘
- 3) 於 4 $^{\circ}$ C 下離心 16,000 rpm 10 分鐘, 並且用 200 μ l cold 70% 酒精 wash 沈澱物
- 4) 於 4 $^{\circ}$ C 下離心 16,000 rpm 2 分鐘, 沈澱物用真空抽乾, 之後加入 7 μ l ddH₂O 以懸浮沈澱物(DNA)

B. 變性模板 (denature template) 與 primer 的 annealing 反應

- 1) 7 μ l DNA 加入 2 μ l reaction buffer, 1 μ l T7 primer (1-5 pmol)
- 2) 在 65 $^{\circ}$ C 水浴下加熱 2 mins, 然後使其慢慢冷卻至 35 $^{\circ}$ C 以下 (15-30 分鐘之內), 之後置於冰上備用

C. 準備 termination tube, labeling mix and sequenase enzyme

- 1) termination tube----- 個別加入 2.5 μ l 的 termination mixture 至四個 eppendorf tube (已標示好 A, G, C, T)

2) labeling mixture---- 將 labeling mix 稀釋 5 倍

ex. : 2 μl labeling mix 加入 8 μl H_2O

3) sequenase enzyme--- 將 sequenase enzyme 稀釋 8 倍

ex. : 1 μl sequenase enzyme 加入 7 μl enzyme dilute buffer

D. Labeling reaction

1) 事先將 termination tubes 在 37 °C 加熱(至少 1 分鐘)

2) 取 10 μl ice-cold annealed DNA mixture 加入 1 μl 0.1 M DTT ,

0.5 μl 「 α - ^{35}S 」 dATP , 2 μl labeling mix (已稀釋) ,

2 μl Sequenase polymerase (已稀釋) , mix 後在室溫反應 2-5 分鐘.

E. 終止反應 (termination reaction)

1) 分別取 3.5 μl labeling reaction 到四個 termination tube (A,G,C,T)

2) mix 後在 37 °C 下反應 5 分鐘 , 再加入 4 μl stop solution

F. Loading

在 loading sample 之前需先將 samples 在 90 °C 下加熱 2-3 分鐘 ,
每個 well loading 2.5 μl sample

G. 8M 尿素 - 8 % (20 : 1) 聚丙烯醯胺凝膠之製備

1) 500 ml (20 : 1) 8% urea sequence gel 的製備

5.4 g Tris base , 2.75 g boric acid , 2 ml EDTA (0.5M, pH8.0) ,
212.5 g urea , 40 g acrylamide , 2 g bis-acrylamide , 再加入
dH₂O 至 500 ml 後過濾

2) 取 90 ml 上述 sequence gel 加入 427.5 μl 10% ammonium
persulfate , 83.7 μl TEMED

3) 將上述配置好的凝膠溶液 , 小心注入已準備好的玻璃裝置中

H. 電泳的操作 (electrophoresis)

- 1) 將已凝聚之板膠用夾子固定到電泳裝置上，將電泳槽內注滿緩衝液 (1X TBE buffer)，凝聚先以 45 W，1,600V，100Amp (Stratagene power system) 預熱 30 分鐘，之後清洗 comb，取 2.5 μ l loading sample，進行 electrophoresis (1,600V，100mA，45W) 分析
- 2) 將凝膠轉移置 3 MM paper 上並且在凝膠上覆蓋一層 PE membrane，再放置 gel dryer 上，70 $^{\circ}$ C 下乾燥 45 分鐘後，在室溫下作自動放射顯影

實驗結果

一、ALTI cDNA 的增幅(amplification)

在大葉合歡(ALTI)開花後一個月，現採新鮮青色未成熟的 ALTI 種子，並且迅速置於乾冰中。至於實驗室後取出種子研磨，以萃取 total mRNA，並且利用 M-MLV reverse transcriptase 進行第一股 cDNA 的合成，再以此 cDNA 為模板，以 encode ALTI A 鏈的胺端和 B 鏈的端各 8 個胺基酸 encode 的 oligonucleotides 當作 primers (primers *Astart* /*Astop*) (圖二)，利用 PCR 來增幅 ALTI 的 cDNA。PCR 的產物經由 0.8 % agarose gel 電泳分析(圖三)得到一段約 0.52 kb 的片段。

二、ALTI cDNA 的分析

為了獲得純的 ALTI cDNA 以便能順利將 ALTI cDNA 接入載體(vector)中，使用 PCRapid™ purification kit 純化 PCR 的產物，而純化的 ALTI cDNA(圖四)以與 TA cloning vector 3 : 1 的比例進行接合反應(ligation)，之後將經 ligation 的 vectors 送入宿主細胞(JM109)內大量繁殖。未接任何 cDNA 的 vector 由於具有 Lac gene 可以將 plate 上的 X-gal 代謝成藍色的產物，而使整個菌落呈現藍色。但是若 vector 接入 cDNA 則會破壞 Lac gene 使宿主細胞無法代謝 X-gal，因此呈現白色菌落。所以當挑選白色菌落來確認 ALTI cDNA 有無完整的接入載體中。將白色的菌落大量繁殖(5 ml)，利用 DNA 的微量抽取方式 (solution I、II、III) 抽出質體(plasmid)，並且用 *EcoRI* (載體上有 *EcoRI* 限制酶的切割位置) 將 ALTI cDNA 切出(圖五)。在圖六可見 Lane 2、3 可能為完整 ALTI cDNA 的菌落。再將 PCR 放大的 ALTI cDNA(圖七：Lane 1)與經選殖而來的 ALTI cDNA (Lane 2)做個比較。結果經由選殖而來的 ALTI cDNA 因為有帶載體的一小片段，故片段較由 PCR

放大而來的 ALTI cDNA 長。大量繁殖可能具有完整 ALTI cDNA 的菌體，並且用 Promega kit 純化質體(plasmid)(圖八)。將這純化的質體用 Sanger 的酵素法定序。因為有二個 plasmid 剛好是正接和反接，所以只採用 T7 primer (17 mers)定 ALTI cDNA 完整的序列。結果 ALTI 的 cDNA 核苷酸共 525 bp，翻譯成 175 個胺基酸(圖九)，與部份已知的 ALTI 胺基酸序列作比較，排列順序皆相同，對於胺基酸組成也有很高的相似性(圖十)。由此證明 PCR 增幅的 DNA 片段為 ALTI cDNA coding region，並且也證明成熟的 ALTI 蛋白需要藉由一特殊的蛋白酶進行 post-translation processing，在 Asn¹³⁴-Ser¹³⁵ 之間切一刀，造成二個次單元體(A 鏈和 B 鏈)以組成成熟的 ALTI 蛋白。

這蛋白酶可能水解的位置在 Asn¹³⁴-Ser¹³⁵ 的端，而有趣的是由相思樹(*Acacia confusa*)種子和雞母珠(*Abrus precatorius*)種子所分離的 Abrin 也有相同的水解位置(圖十一)，但是有一點不同的是在 ALTI 中並沒有切掉 Ser¹³⁵。可能是大葉合歡和相思樹、雞母珠皆含有相似的蛋白酶且專一性水解 Asn - Ser 的端進行 post-translation cleavage。從演化觀點來看，可能大葉合歡和相思樹、雞母珠有著遠親的關係。許多單一多肽鏈的 Kunitz-type 胰蛋白酶抑制劑胺基酸排列順序已完成，像大豆胰蛋白酶抑制劑 SBTI，winged-bean trypsin inhibitor-3 (*Psophocarpus tetragolobus*(L.)DC) 和 *Erythrina caffra* trypsin inhibitor，都不具有此蛋白酶水解的位置，可能無法進行 post-translation processing，以致於它們仍是單一多肽鏈。

根據 6 種已知胺基酸排列順序的 Kunitz-family 胰蛋白酶抑制劑 ACTI、SBTI、WBTI-2、WBTI-3、DE-3 (*Erythrina latissima*)和 APTI(*Adenanthera pavonina*)與 ALTI 胺基酸排列順序比較，發現有很高的相似性(圖十二)。

討 論

胰蛋白酶廣泛存在於豆科植物中，自從 1946 Kunitz 首先自大豆中分離出胰蛋白酶抑制劑並分析出結晶，之後許多胰蛋白酶抑制劑相繼從豆科的種子中被分離出。由植物所分離的胰蛋白酶抑制劑，依分子大小及半胱胺酸含量，可大致分為兩種，一種為 Bowman-Birk family，分子量小約 8,000 至 10,000 daltons，半胱胺酸含量占胺基酸總量的 20%，另一種類為 Kunitz-family 分子量約 20,000 daltons，半胱胺酸含量約每一百個胺基酸含有 4 個。此類型蛋白酶抑制劑以 SBTI(Kunitz)為代表。由大葉合歡(*Albizzia lebbek*)種子所分離的 ALTI，分子量 21 kDa 含 4 個半胱胺酸是屬於 Kunitz-type 的抑制劑，大部分 Kunitz-type 的抑制劑都是由單一多肽鏈所組成，而 ALTI 是由雙一多肽鏈所組成，目前僅發現 silk tree seed (*Albizzia julibrissin*)、*Acacia elata*、*Acacia confusa* 和 *A. pavonina* 種子所分離的胰蛋白酶抑制劑是由雙一多肽鏈所組成。由胺基酸組成和胺端胺基酸排列順序比較，ALTI 與雙鏈所組成的抑制劑較單一多肽鏈(SBTI、WBTI-2、WBTI-3 和 ELTI)具有較高的相似性(homology)。(圖十二)

利用 ALTI A 鏈的胺端與 B 鏈的 C 端各 8 個胺基酸，合成 oligonucleotides 當作 primers，以 cDNA 當模板進行 PCR 反應，很快速地選殖出 ALTI cDNA 的 coding region，定序後共含 525 bp 可轉譯成 175 個胺基酸，其序列發現與已知部份的蛋白胺基酸排列順序相同，而對於全部的胺基酸組成也有很高的相似性(圖十)，並且在 Asn¹³⁴-Ser¹³⁵ 之間被切一刀形成 A 鏈和 B 鏈，其中 A 鏈有 135 個胺基酸，而 B 鏈有 40 個胺基酸，所以成熟的 ALTI 需要先經過 Post-translation proteolysis 切一刀，因此與 Odani 等人的推論一樣，由雙鏈所組成的抑制劑是先合成單一多肽鏈再經 post-translation proteolysis 而形

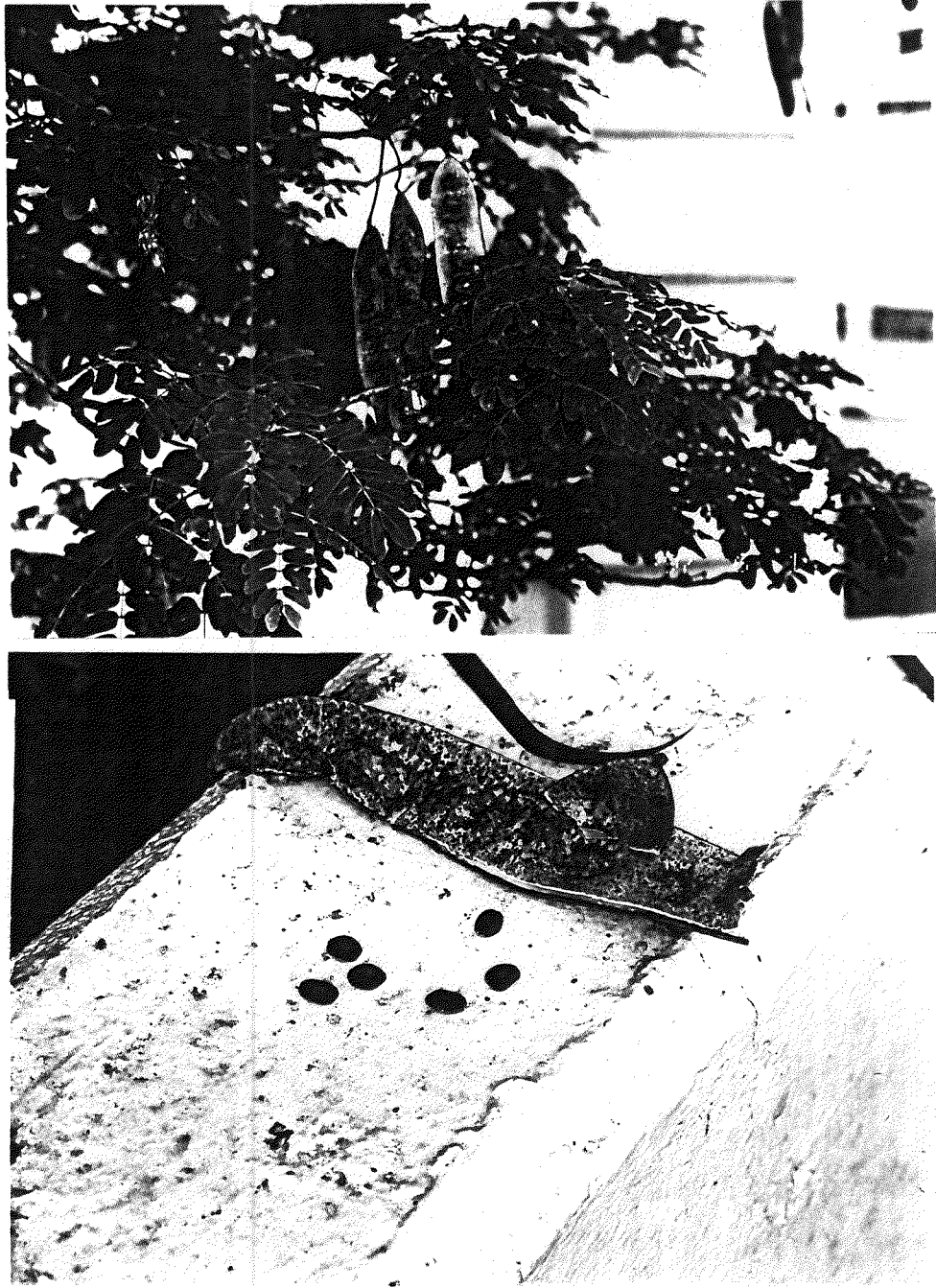
成兩個次單元體。但有趣的是 ALTI 與 ACTI、雞母珠種子所分離的 Abrin 有著相似的水解位置($\text{Ans}^{134}\text{-Ser}^{135}$),但是 ALTI 不像這兩者一樣將 Ser 切掉,而只是在 $\text{Ans}^{134}\text{-Ser}^{135}$ 之間切一刀並沒有將任何一個胺基酸切除。因此 ALTI 具有不同形式的 post-translation proteolysis。(圖十一)

胰蛋白酶抑制劑與胰蛋白酶之間的作用方式之反應機轉,向來為學者所重視。不少報告顯示,多數抑制劑與胰蛋白酶結合的位置即為酵素催化的位置,而胰蛋白酶水解蛋白質胾月肽鏈之特異位置為精胺酸或離胺酸。而在 1968 年 Liu 等人依胰蛋白酶抑制劑的活性位置將胰蛋白酶抑制劑區分成精胺酸型(Arg-)與離胺酸型(Lys-)兩大類,若用化學修飾法將前者的精胺酸或後者的離胺酸修飾,則會使胰蛋白酶抑制劑喪失其抑制的活性。常見的精胺酸型胰蛋白酶抑制劑包括有大豆中的 Kunitz 胰蛋白酶抑制劑、WBTI、APTI 以及來自 Garden、蓖麻子、苦瓜等分離出的胰蛋白酶抑制劑。而離胺酸型胰蛋白酶抑制劑則包括有大豆的 Bowman-Birk 胰蛋白酶抑制劑,賴馬豆、雞豆、ACTI 與 *Acacia elata* 胰蛋白酶抑制劑。

在 Kunitz-type 的胰蛋白酶抑制劑中已知 WBTI-2 與 WBTI-3 活性位置位於 $\text{Arg}^{64}\text{-Ser}^{65}$ 、ELTI(DE-3)位於 $\text{Arg}^{63}\text{-Ser}^{64}$ 而 SBTI 位於 $\text{Arg}^{63}\text{-Ile}^{64}$ 、APTI 位於 $\text{Arg}^{64}\text{-Ile}^{65}$ 、ACTI 位於 $\text{Lys}^{64}\text{-Ile}^{65}$ 上。在七種豆類植物(Leguminales)所分離的 Kunitz-type 胰蛋白酶抑制劑胺基酸排列順序比較(圖十二),結果發現 ALTI 與其它六種 Kunitz-type 胰蛋白酶抑制劑有很高的相似性,所以推測 ALTI 的活性位置也是在 $\text{Arg}^{64}\text{-Ile}^{65}$ 上。並且 ALTI 蛋白酶經由一般精胺酸的化學修飾,主要是利用雙酮類或雙醛類的化學藥品來與精胺酸的 guanido 基反應,結果 ALTI 蛋白酶喪失其抑制的活性⁽⁴⁹⁾,由以上可知 ALTI 是屬於精胺酸型胰蛋白酶抑制劑,且活性位置是在 $\text{Arg}^{64}\text{-Ile}^{65}$ 。

1991 年 Onesti 等人將 *Erythrina caffra* Kunitz-type 胰蛋白酶抑制劑的三級立體結構已決定出，由 Cys³⁹-Cys⁸³ 這對雙硫鍵連結兩個 loops 並且位於分子的表面，而 Cys¹³²-Cys¹³⁹ 則是連結兩個 β -strands，所以破壞 Cys³⁹-Cys⁸³ 這對雙硫鍵對整個分子的結構影響有限，但是當破壞 Cys¹³²-Cys¹³⁹ 這對雙硫鍵時造成整個分子三級結構改變，會進而影響其抑制胰蛋白酶的活性。而 Kunitz-type 的胰蛋白酶抑制劑都具有兩對雙硫鍵且位置都具有保留性(圖十二)，同時由於 ALTI 蛋白經由還原與甲基化分離 A 鏈和 B 鏈之後，再經酸水解的結果顯示 A 鏈含有 3 個半胱胺酸，而 B 鏈含有 1 個半胱胺酸⁽⁴⁹⁾，再加上 ALTI 與 ACTI 的胺基酸序列有 89.1 % 的相似性，而在核苷酸序列上也有 91.6 % 的相似性，故推測 ALTI 的兩對雙硫鍵位於 Cys⁴⁰-Cys⁸⁶，Cys¹³²-Cys¹⁴¹，而且推測 Cys¹³²-Cys¹⁴¹ 這對雙硫鍵對於 ALTI 蛋白酶整個分子的三級結構非常重要，如果被破壞可能會影響其抑制胰蛋白酶的活性。

圖表與圖表說明



圖一、A 圖：大葉合歡(ALTI)植物實景

B 圖：大葉合歡成熟的種子

此時的果莢呈褐色，種子已成熟。然而純化 ALTI RNA 所用的種子，是剛開花結果不久，青綠色的果莢、青嫩的種子

ALTI A 鏈 : N-terminus Lys-Glu - Leu -Leu -Asp - Ala - Asp - Gly

Primers *Astart* : 5' AAA.GAA.CTA.CTA.GAC.GCA.GAC.GGA 3'

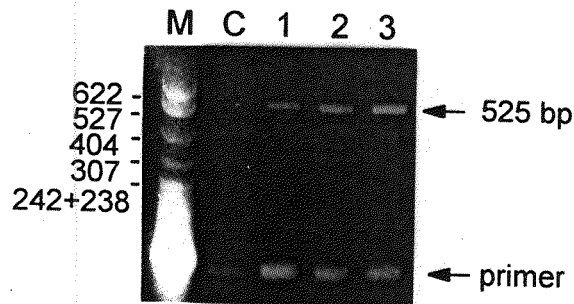
G	G	C	C	T	C	T	C
	G	G		G		G	
	T	T		T		T	

ALTI B 鏈 : Phe - Glu - Lys - Ala - His - Arg - Ser - Gly C-terminus

Primers *Astop* : 3' AAA.CTC.TTC.CGA.GTA.GCA.AGA.CCA 5'

G	T	T	C	G	C	C	C
			G		G	G	G
			T		T	T	T

圖二、PCR 的二個 Primers 以及相對應的胺基酸。primers *Astart* 代表 A 鏈 N 端前 8 個胺基酸的 encodes ; primers *Astop* 代表 B 鏈 C 端後 8 個胺基酸的 encodes 。



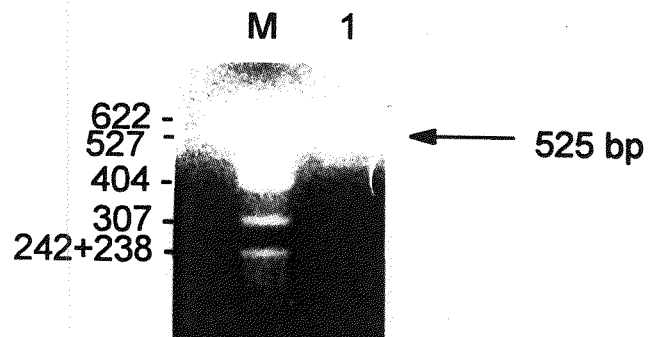
圖三、聚合酶鏈反應 (Polymerase chain reaction, PCR)

由 ALTI 種子純化而來的 total mRNA，經過第一股 cDNA 的合成後，在經過 PCR 反應放大，得到 525 bp 的 ALTI ds cDNA

M : pBR322 DNA-MspI digest marker

C : control 組，反應條件同實驗組，但未加 ALTI 第一股的 cDNA

Lane 1、2、3 : ALTI 第一股 cDNA 經過 primer pairs Astart/Astop 放大的 PCR 產物



圖四、PCR 產物的純化

利用 PCRapid™ purification kit 直接純化 PCR 產物

M : pBR322 DNA-MspI digest marker

Lane 1 : 純化後的 ALTI cDNA , 具有 525 bp fragment

LacZ gene: bases 1-571
Sp6 promoter: bases 239-255
Multiple Cloning Site: bases 269-381
T7 promoter: bases 388-407
F1 origin: bases 572-986
Kanamycin resistance: bases 987-2114
Ampicillin resistance: bases 2133-2992
ColE1 origin: bases 3182-3765

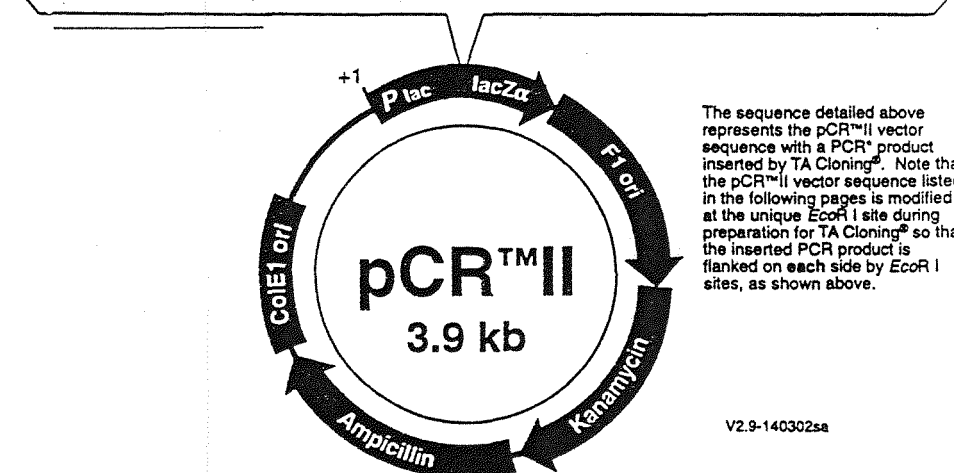
M13 Reverse Primer	Sp6 Promoter
CAG GAA ACA GCT ATG AG	AT TTA GGT GAC ACT ATA
GTC CTT TGT CGA TAC TG	TA AAT CCA CTG TGA TAT

NsiI	HindIII	KpnI	SacI	BamHI	SpeI
TAC TCA AGC TAT GCA TCA AGC TTG GTA CCG AGC TCG GAT CCA CTA GTA ACG GCC					
ATG AGT TCG ATA CGT AGT TCG AAC CAT GGC TCG AGC CTA GGT GAT CAT TCG CCG					

BstXI	EcoRI	ALTI cDNA	EcoRI	EcoRV
GCC AGT GTG CTG GAA TTC GGC TTT	AA	PCR Product	AA	GCC GAA TTC TGC AGA TAT
CCG TCA CAC GAC CTT AAG CCG AAT	TT		TT	CGG CTT AAG ACG TCT ATA

AvaI	PaeR7I				
BstXI	NotI	XhoI	NsiI	XbaI	ApaI
CCA TCA CAC TGG CCG CCG CTC GAG CAT GCA TCT AGA GGG CCC AAT TCG	CCC TAT				
GGT AGT GTG ACC GCC GGC GAG CTC GTA CGT AGA TCT CCC GGG TTA AGC	GGG ATA				

T7 Promoter	M13 (-20) Forward Primer	M13 (-40) Forward Primer
AGT GAG TCG TAT TA	CTG GCC GTC GTT TTA C	AA CGT CGT GAC TGG GAA AAC
TCA CTC AGC ATA AT	GAC CCG CAG CAA AAT G	TT GCA GCA CTG ACC CTT TTG



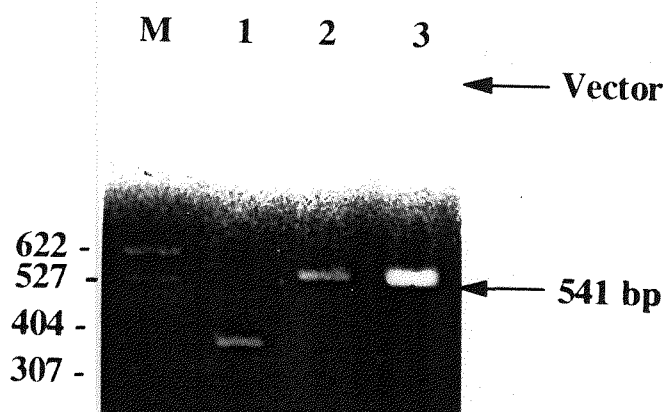
The sequence detailed above represents the pCR™II vector sequence with a PCR[®] product inserted by TA Cloning[®]. Note that the pCR™II vector sequence listed in the following pages is modified at the unique EcoR I site during preparation for TA Cloning[®] so that the inserted PCR product is flanked on each side by EcoR I sites, as shown above.

V2.9-140302sa

* Performance of the polymerase chain reaction ("PCR") is covered by patents owned and licensed by Hoffmann-LaRoche, Inc. and Roche Molecular Systems, Inc. Purchase of any of Invitrogen's PCR-related products does not convey a license to use the PCR process covered by these patents. Purchasers of any of Invitrogen's PCR-related products must obtain a license to use the PCR process before using the product.

圖五、TA vector 的 mapping

可知 ALTI cDNA 構築於 TA vector 上的位置以及 DNA 定序開始的位置



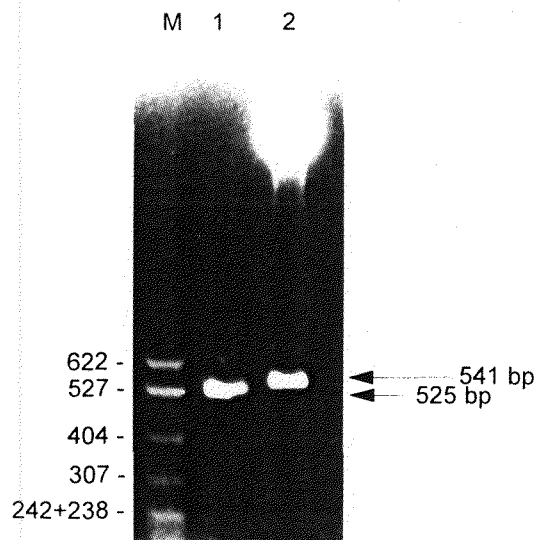
圖六、質體 DNA 的微量抽取

將純化的 ALTI cDNA 接入 TA cloning vector 中，再送入 competent bacterial cells，JM109 中大量繁殖後，挑選菌落抽取其質體 DNA 以檢查 ALTI cDNA 是否接入 vector 中。利用 solution I、II、III 的方式抽取質體 DNA 後，再用 *EcoRI* digest 質體 DNA 後，再進行 0.8 % agarose gel 的電泳分析

M : pBR322 DNA-MspI digest marker

Lane 1 : 此菌所攜帶的質體 DNA 並非想要的

Lane 2、3 : 這些菌所攜帶的可能是完整的 ALTI cDNA，具有 541 bp (525 bp ALTI cDNA 加上由 vector 而來的 16 bp)

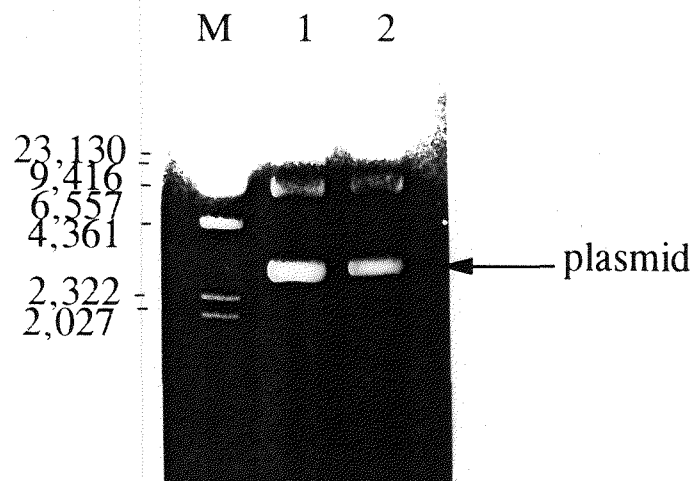


圖七、比較由 PCR 產物純化而來的 ALTI cDNA 和由 JM109 抽取的質體 DNA 經 *EcoR I* digest 之後的 ALTI cDNA

M : pBR322 DNA-*MspI* digest marker

Lane 1 : 由 PCR 而來的 ALTI cDNA (525 bp)

Lane 2 : 由 *EcoR I* digest 質體 DNA 而來的 ALTI cDNA (541 bp)



圖八、純化 JM109 中的質體 DNA (plasmid)

以便進行 DNA 定序

M : Lambda/Hind III- ϕ X174/Hae III marker

Lane 1、2 : 純的含有 ALTI cDNA 的質體 DNA (plasmid)

Amino acid	nALTI	cALTI	nA-subunit	cA-subunit	nB-subunit	cB-subunit
Glycine	14.8 (15)	15	12.2 (12)	12	3.1 (3)	3
Alanine	11.3 (11)	11	8.9 (9)	9	1.8 (2)	2
Valine	10.1 (10)	10	6.8 (7)	7	2.9 (3)	3
Leucine	19.3 (19)	17	14.7 (15)	13	4.2 (4)	4
Isoleucine	9.9 (10)	11	8.2 (8)	9	1.9 (2)	2
Serine	9.8 (10)	10	6.1 (6)	6	3.8 (4)	4
Threonin	6.3 (6)	5	5.8 (6)	5	0	0
Cysteine	4.1 (4)	4	2.9 (3)	3	1.2 (1)	1
Tyrosine	6.9 (7)	7	6.8 (7)	7	0	0
Asx	18.9 (19)	20	10.2 (10)	11	9.1 (9)	9
Glx	20.3 (20)	20	18.1 (18)	18	2.1 (2)	2
Arginine	10.1 (10)	10	7.3 (7)	7	2.8 (3)	3
Lysine	13.3 (13)	12	10.1 (10)	9	3.1 (3)	3
Histidine	2.8 (3)	3	1.3 (1)	1	2.2 (2)	2
Phenylalanine	6.1 (6)	6	5.2 (5)	5	1.1 (1)	1
Tryptophan	2	2	2	2	2	0
Proline	12.3 (12)	12	11.1 (11)	11	0.9 (1)	1
Total	177	175	137	135	40	40
M.W.	21240	21000	16440	16200	4800	4800

圖十、比較天然種子與基因選殖出的 ALTI 胺基酸組成

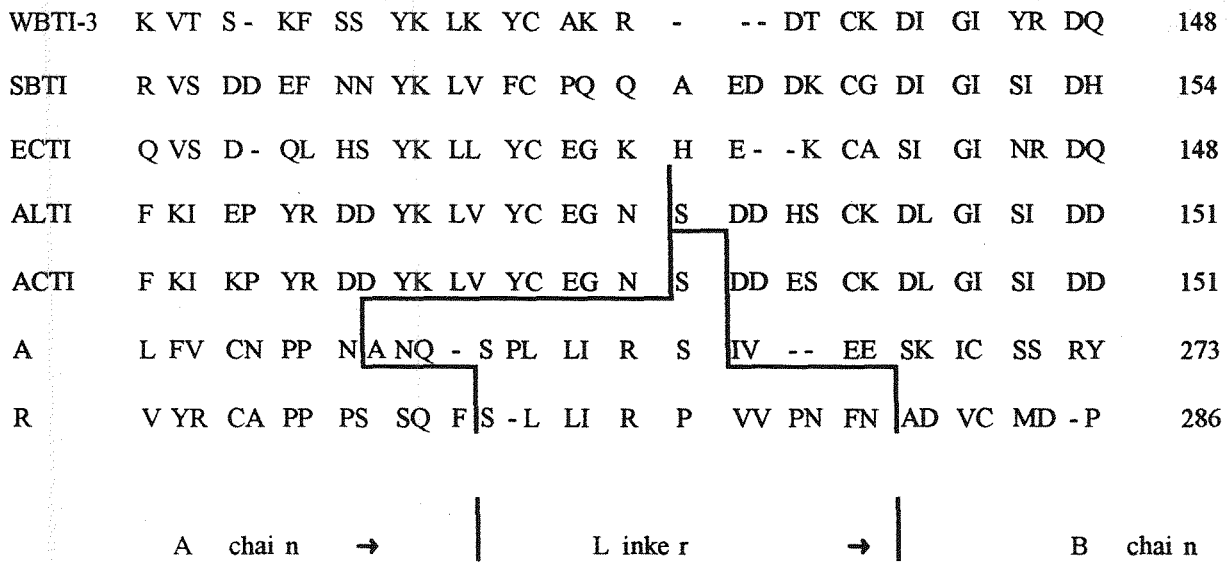
M.W. : Molecular weight

nALTI : nature ALTI (從天然的種子分析而來的資料)

nA-subunit、nB-subunit : 天然種子種子中的 A 鏈和 B 鏈

cALTI : cDNA ALTI (經由基因選殖而來的資料)

cA-subunit、cB-subunit : 由基因選殖而來的資料與天然種子種子中的 A 鏈和 B 鏈相比較而來的



圖十一、比較植物中蛋白的 linker 序列

比較四種植物中具有 linker 的胰蛋白酶抑制劑：*Albizzia lebbek* trypsin inhibitor (ALTI)、*A. confusa* trypsin inhibitor (ACTI)、abrin-a (A)和 ricin-D(R)以及三種植物中沒有 linker 的胰蛋白酶抑制劑：*soybean* trypsin inhibitor (SBTI)、winged bean trypsin inhibitor-3 (WBTI-3)和 *Erythrina caffra* trypsin inhibitor (ECTI)。

1

ALTI	K E L L D A D G D I L R N G G T Y Y I V P A F R G K G G G L
ACTI	K E L L D A D G D I L R N G G A Y Y I L P A L R G K G G G L
ELTI	- V L L D G N G E V V Q N G G T Y Y L L P Q V W A Q G G G V
SBTI	D F V L D N E G N P L E N G G T Y Y I L S D I T A F G - G I
WBTI-2	Z E L V D V E G K T V R N G G T Y Y L V P Q L R P G G G G M
WBTI-3	E P L L D S E G E L V R N G G T Y Y L L P D R W A L G G G I
APTI	R E L L D V D G N F L R N G G S Y Y I V P A F R G K G G G L

31

ALTI	T L A K I G D E S C P L N V V Q A Q S E T K R G L P A V I W
ACTI	T L A K I G D E S C P L T V V Q A Q S E T K R G L P A V I W
ELTI	Q L A K T G E E T C P L T V V Q S P N E L S D G K P I R I R
SBTI	R A A P T G N E R C P L T V V Q S R N E L D K G I G T I I S
WBTI-2	E A A K V G N E D C P L T V V K S L D E N S N G E P I R I A
WBTI-3	E A A A T G T E T C P L T V V R S P N E V S V G E P L R I S
APTI	E L A R T G S E T C P R T V V Q A P A E Q S R G L P A R L S

61

ALTI	T P P R I A - I L T P A F Y L N I E F Q P R D P P A C L E E
ACTI	T P P K I A - I L T P G F Y L N F E F Q P R D L P A C L Q K
ELTI	S R L R S T F I P D D - - - D E V R I G F A Y A P K C A P S
SBTI	S P Y R I R F I A E G H P L S L K F D S F A V I M L C V G I
WBTI-2	S R L R S T F I P E Y - - - S L V N L G F A D P P K C A P S
WBTI-3	S Q L R S G P I P D Y - - - S L V R I G F A N P P K C A P S
APTI	T P P R I R Y I G P E F Y L T I E F E E Q - K P P S C L R D

91

ALTI	Y - - S R L S W K V E G E S - Q E V K I A P - E K E Q H L F
ACTI	Y - - S T L P W K V E G E S - Q E V K I A P K E K E Q F L V
ELTI	P - - W W T V V E D E Q E G L - S V K L S E D E S T Q F D Y
SBTI	P - T E W S V V E D L P E G - P A V K I G E N K D A M - D G
WBTI-2	P - - F W T V V K D Q S E R L P S I K L G E Y K D S E L D Y
WBTI-3	P - - W T V V E D Q P O - P S V K L S E L K S T K F D Y
APTI	S N L Q W K V E E S Q Q I V K I A S K E E E Q L F G S F Q I

121

ALTI	G S F K I E P Y R - D D - - - Y K L V Y C - E G N S D - D
ACTI	G S F K I K P Y R - D D - - - Y K L V Y C - E G N S D - D
ELTI	P - F K F E Q V S - - D K L H S Y K L L Y C - - - E G K H
SBTI	W - F R L E R V S - D D E F N N Y K L V F C - P Q Q A E - D
WBTI-2	P - F K F E R V Y A A S K M Y A Y K L L Y C G S E D E E E E
WBTI-3	L - F R F E K V I - - S K F S S Y K L K Y C A K R D - - -
APTI	K P Y R - - - - - D D - - - Y K L V Y C E P Q Q G G R -

151

ALTI	H S C K D L G I S I D - D E N N R R L L V V K D G D P L A V R
ACTI	E S C K D L G I S I D - D E N N R R L V V K D G H P L A V R
ELTI	E K C A S I G I N R D Q - K G Y R R R L V V T E D N P L T V V
SBTI	D K C G D I G I S I D H D D G T R R R L V V S K N K P L V V Q
WBTI-2	M M C K D I G V Y R D Q - E G Y Q R L V V S K H N P L V V G
WBTI-3	- T C K D I G I Y R D Q - K G Y A R L V V T E N P L V V I
APTI	L E C K D L G I S I D - D D N N R R L A V K E G D P L V V Q

181

ALTI	F E K - A H R S G
ACTI	F E K - A H R S G
ELTI	L K K V E S S - -
SBTI	F Q K L D K E S L
WBTI-2	F K K V E S S T I
WBTI-3	F K K V E S S - -
APTI	F V N A D R E G N

圖十二、ALTI amino acid 序列與其它的 Kunitz-type trypsin inhibitor 作比較。ACTI : *Acacia confusa* trypsin ; SBTI : soybean trypsin inhibitor Ti^a ; WBTI-2 : acidic winged-bean trypsin inhibitor-2 ; WBTI-3 : basic winged-bean trypsin inhibitor-3 ; ELTI : *E. latissima* (DE-3) trypsin inhibitor ; APTI : *Adenanthera pavonina* trypsin inhibitor。相同 amino acids 用線框起來。

1. Armstrong, B., and Doll, R. (1975) Environmental factors and cancer incidence and mortality in different countries, with special reference to dietary factors. *Int. J. Cancer.* 15, 617-631.
2. Correa, P. (1981) Epidemiological correlations between diet and cancer frequency. *Cancer Res.* 41, 3685-3690.
3. Phillips, R. L. (1975) Role of life-style and dietary habits in risk of cancer among Seventh-Day Adventists. *Cancer Res.* 35, 3513-3522.
4. Qdani, S., Ono, T. and Ikenata, T. (1979) Proteinase inhibitors from a Mimosoidae Legume, *Albizzia julibrissin*. *J. Biochem. (Tokyo).* 86, 1795-1805.
5. Saheki, T., Matsuda, Y. and Holzer, H. (1974) Purification and characterization of macromolecular inhibitors of proteinase A from Yeast. *Eur. J. Biochem.* 47, 325-332.
6. Matern, H., Hoffmann, M. and Holzer, H. (1974) Isolation and characterization of the carboxypeptidase Y inhibitor from yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 71, 4874-4878.
7. Omichi, K. (1980) The reactive site of streptomyces subtilisin inhibitor. *J. Biochem.* 87, 483-489.
8. Kohga, S. (1978) Thromboplastic and fibrinolytic activities of ascites tumor cells of rats, with reference to their role in metastasis formation. *Gann.* 69, 461-470.
9. Jone, P. A. and Declerck, Y. A. (1980) Destruction of extracellular matrices containing glycoproteins, elastin and collagen by metastatic tumor cells. *Cancer Res.* 40, 3222-3227.

10. Burger, M. M. (1970) Proteolytic enzymes initiating cell division and escape from contact inhibition of growth. *Nature*. 227, 170-171.
11. Sefton, B. M. and Rubin, H. (1970) Release from density dependent growth inhibition by proteolytic enzymes. *Nature*. 227, 843-845.
12. Vogel, R., Trautscnold, I. and Werle, E. (1968) Natural proteinase inhibitors. pp. 41, Academic Press, New york.
13. Laskowski, M. and Kato, I. (1980) Protein inhibitors of proteinases. *Ann. Rev. Biochem.* 49, 459-626.
14. Liener, I. E. and Kakade, M. L. (1969) Toxicants occuring naturally in foodstuffs (Liener, I. E. ed) Academic Press, New York.
15. Ryan, C. A. (1973) Proteolytic enzymes and their inhibitor in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 24, 173-196.
16. Bowles, D. J. (1990) Defense-related proteins in higher plants. *Ann. Rev. Biochem.* 59, 873-907.
17. Read, I. W. and Haas, L. W. (1938) Baking quality of flour as affect by certain enzynme actions (V) $KBrO_3$ and enzyme activity. *Cereal Chem.* 15, 59.
18. Ham, W. E. and Sandstedt, R. M. (1044) A proteolytic inhibitory substance in the extract from unheated soybean meal. *J. Biol. Chem.* 154, 505-506.
19. Kunitz, M. (1946) *J. Gen. Physiol.* 29, 149-154.
20. Leiner, I. E. (1958) Processed plant protein foodstuffs. pp. 79-129., Academic Press, New York.

21. Leiner, I. E. (1962) Toxic factors in edible Legumes and their elimination. *Am. J. Clin. Nutr.* 11, 281-298.
22. Rackis, J. J. (1965) Physiological properties of soybean trypsin inhibitors and their relationship to pancreatic hypertrophy and growth inhibition of rats. *Federation Proc.* 24, 1488-1493.
23. Mickelsen, O. and Yang, M. G. (1966) Naturally occurring toxicants in foods. *Federation Proc.* 25, 104-123.
24. Pusztai, A. (1967) Trypsin inhibitors of plant origin, their chemistry and potential role in animal nutrition. *Nutr. Abstr. Rev.* 37, 1.
25. Liener, I. and Soyin, E. (1953) A toxic protein from the soybean, I. inhibition of rat growth. *J. Nutr.* 49, 527-539.
26. Garlich, J. D. and Nesheim, M. C. (1966) Relationship of fraction of soybeans and a crystalline soybean trypsin inhibitor to the effects of feeding unheated-soybean meal to chicks. *J. Nutr.* 88, 100-110.
27. Gertler, A., Birk, Y. and Bondi, A. (1967) A comparative study of the nutritional and physiological significance of pure soybean trypsin inhibitors and of ethanol extracted soybean meals in chicks and rats. *J. Nutr.* 91, 358-370.
28. Kortt, A. A. and Jermyn, M. A. (1981) Acacia inhibitors. Purification and properties of the trypsin inhibitors from *Acacia elata* seed. *Eur. J. Biochem.* 115, 551-557.
29. Bosterling, B. and Quast, U. (1981) Soybean trypsin inhibitor (Kunitz) is double headed. kinetics of the interaction of α -chymotrypsin with each side. *Biochem. Biophys. Acta.* 657, 58-72.

30. Wilson, K. A. and Laskowski, M. Sr. (1975) The partial amino acid sequence of trypsin inhibitor II from garden bean, *Phaseolus vulgaris*, with location of the trypsin and elastase-reactive sites. *J. Biol. Chem.* 250, 4261-4267.
31. Sakato, K., Tanaka, H. and Misawa, M. (1975) Broad specificity proteinase inhibitors in *Scopolia japonica* (Solanaceae) cultured cells. *Eur. J. Biochem.* 55, 221-230.
32. Stevens, F. C., Wnerz, S. and Krahn, J. Proteinase inhibitors. pp. 325, Bayer Symposium V, Springer-Verlag, New York.
33. Umezawa, H. (1976) Structures and activities of protease inhibitors of microbial origin. *Methods Enzymol.* 45, 678-695.
34. Pubols, M. H., Bartelt, D. C. and Greene, L. J. (1974) Trypsin inhibitor from human pancreas and pancreatic juice. *J. Biol. Chem.* 249, 2235-2243.
35. Barret, A. J. and Starkey, P. M. (1973) The interaction of 2-Macroglobulin with proteinases. *Biochem. J.* 133, 709-724.
36. Ozawa, K. and Laskowski, M. (1966) The reactive site of trypsin inhibitors. *J. Biol. Chem.* 241, 3955-3961.
37. Schiessler, H., Fink, E. and Fritz, H. (1976) Acid-stable proteinase inhibitors from human seminal plasma. *Methods Enzymol.* 45, 847-859.
38. Meloun, B., Cechora, D. and Jonakova, V. (1984) Homologous in the structures of bull seminal plasma acrosin inhibitors and comparison with other homologous proteinase inhibitors of the Kazal type. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. Bd.* 364, 1665-1670.

39. Richardson, M. (1977) The proteinase inhibitors of plant and microorganisms. *Phytochemistry*. 16, 159-169.
40. Hass, G. M., Venkatakrishnan, R. and Ryan, C. A. (1976) Homologous inhibitors from potato tubers of serine endopeptidases and metallo-carboxypeptidases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 73, 1941-1944.
41. Ozawa, K. and Laskowski, M. jr. (1966) The reactive site of trypsin inhibitors. *J. Biol. Chem.* 241, 3955-3961.
42. Tan, C. G. L. and Stevens, F. C. (1971) Amino acid sequence of lima bean protease inhibitor component IV ; Isolation and sequence determination of the trypsin peptides. *Eur. J. Biochem.* 18, 503-514.
43. Laskowski, M. jr. and Sealock, R. W. (1971) *The enzymes* (Boyer, P ed) 3, 375 Academic Press, New York.
44. Kortt, A. A. and Jermyn, M. A. (1981) Acacia proteinase inhibitors. Purification and properties of the trypsin inhibitors from *Acacia elata* seed. *Eur. J. Biochem.* 115, 551-557.
45. Habener, J. F. (1981) Regulation of parathyroid hormone secretion and biosynthesis. *Annu. Rev. Physiol.* 43, 211-223.
46. Docherty, K. and Steiner, D. F. (1982) Post-translational proteolysis in polypeptide hormone biosynthesis. *Annu. Rev. Physiol.* 44, 625-638.
47. Douglass, J., Civelli, O. and Herbert, E., (1984) Ployprotein gene expression generation of diversity of neuroendocrine peptides. *Annu. Rev. Biochem.* 53, 665-715.
48. Gill, D. M. and Pappenheimer jr., A. M. (1971) Structure-activity relations in diphtheria. *J. Biol. Chem.* 246, 1492-1495.

49. 陳玉美，(1996) 大葉合歡種子胰蛋白酶抑制劑之純化及性質研究，
碩士論文，中山醫學院生物化學研究所

第四部份：

在假懷孕雌鼠之子宮蛻膜瘤發育中 MMP-2 的活化和
細胞增生的相關性

Activation of MMP-2 associated with the cell proliferation
during the development of deciduomata
in pseudopregnant rats

中山醫學院生物化學研究所

指導教授：謝易修 博士(Yih-Shou Hsieh, Ph.D.)

研究生：林麗娟 (Li-Jen Lin)

中文摘要

一般結婚夫妻約 15% 會有不孕症。而導致不孕症的原因有很多，但是不孕的成因中著床不良比無法受精更為常見。從最近的研究看來，造成著床失敗有兩大原因：第一是胚胎品質不良，第二是子宮內膜接受性不良。一般而言，子宮內膜的厚度在排卵時低於八毫米，這個卵就算是順利受精也難以著床。因此要改善著床率，排卵前改善子宮內膜的厚度，要比排卵後使用黃體素來安胎來的有效的多。

然而在子宮內膜再生的週期中，已有學者發現 MMPs 家族成員彼此以協調的方式出現在不同的週期中。因此我們藉由假懷孕雌鼠在刮傷刺激(類似胚胎著床)下，子宮內膜厚度的變化(蛻膜瘤組織的形成)和 MMP-2 的相關關係做個探討。結果在受刮傷刺激的假懷孕鼠之子宮蛻膜瘤(deciduomata)和子宮肌膜(myometrium)中發現 62、72 和 92 kd gelatinase 的活性隨著子宮蛻膜瘤增殖與子宮肌膜腫大而改變，而且 62 和 72 kd gelatinases optimal pH 值為 pH 7，活性受 EDTA 所抑制所以是 metalloproteinase 並且為 Ca^{2+} -dependent。將蛻膜瘤組織的研磨液用 thermolysin 處理似乎會將 72 kd gelatinase 切成 62 kd gelatinase，因此我們認為 MMP-2 活化增加，可能與蛻膜瘤生成有關。

英 文 摘 要

Matrix metalloproteinases are a highly regulated family of enzymes, that together can degrade most components of the extracellular matrix. These proteins are active in normal and pathological processes involving tissue remodeling. Abnormal expression of gelatinase may result in cell proliferation and invasion. In this study we determined the proteolytic activities in the deciduoma tissue of pseudopregnant rat on day 0, 1, 2, 3, 5, 7, 9 of decidualization. The result showed that 62 and 72 gelatinases in the deciduomata and myometrium were changed during the development of the deciduomata. These enzymes have optimal activity at pH 7 and were inhibited by metal ion chelator(EDTA). Whereas, the inhibition was reversed by Ca^{2+} but not Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Mn^{2+} and Mg^{2+} . Thus, we suggested that the increased activation of the MMP-2 may be associated with the growth of deciduomata.

緒 言

一般「受孕」過程是男人產生正常活動且足夠量的精子，輸送貯積到女人的子宮頸，活躍的精子經由子宮頸及子宮腔輸送到輸卵管的底端；同時卵巢內的濾泡發育成熟，排出卵子，並輸送到輸卵管底部，和精子相逢「受精」，「受精卵」在從輸卵管輸送到子宮腔內著床，由卵巢分泌足夠的荷爾蒙使「胚胎」發育生長。因此為達到成功的懷孕，必須具備有下列因素：1.有排卵的發生 2.有足夠數量與活動力的精子 3.在接近排卵期時行性生活 4.保持生殖道通暢 5.卵子與精子的遺傳因子相互配合 6.有適當的地方讓受精卵著床。所以任一階段的不足都是造成不孕症的原因。不孕症乃指無法達到或完成懷孕的病症。正常夫妻大約 80% - 90% 在一年內會懷孕，而一般人相信不孕症會發生在約 15% 的結婚夫妻身上，在臨床上除非是夫妻已試圖懷孕十八個月之久仍失敗，才給予不孕症的治療。以目前的技術可使不孕症夫婦中大約 50% 達到懷孕。

而導致不孕症的原因可能是：在男人方面，精子數量不足或活動性不好，副睪或輸精管阻塞，逆行射精或性無能，甚至尿道下裂都是男人不孕的原因。

在女人「陰道方面」的原因則有發炎或性交疼痛，「子宮頸方面」因發炎、狹窄、分泌不足或抗體排斥；在「子宮腔方面」因發炎、腫瘤或先天畸形，在「輸卵管方面」因阻塞、粘黏、攏狀部功能不足；在「卵巢方面」因不排卵、黃體素不足或粘黏都是造成女人不孕症的原因。

依照報導，婦產科醫師依不孕症門診人數推估，國內的不孕症人口超過十二萬人，有的夫婦為了自己孕育一個孩子，不惜千辛萬苦做各種嘗試，精神實在令人敬佩。近幾年來，人工受孕和試管嬰兒兩項

幾乎認為是治療不孕的最後手段；實際上，人工受精的平均受孕率只有六到七成，但流產率也高達一成半，而且可能要連續嘗試六個月以上才有成功可能。至於試管嬰兒，儘管很多不孕患者都想一試，從誘導排卵、取出卵子、體外受精、植回子宮、懷孕到分娩過程中充滿變數，實際成功率只有一成，而且所費不少，實在不是所有的人都負擔得起的。近年也可用冷凍胚胎技術，先了解此胚胎為 XX(生女)或 XY(生男)，再植入子宮內，幾乎百分之百達到所希望的性別，然美中不足的是其流產率高達百分之二十五。

然不孕的成因中著床不良比無法受精更為常見。從最近的研究看來，造成著床失敗有兩大原因：第一是胚胎品質不良，第二是子宮內膜接受性不良。一般而言，子宮內膜的厚度在排卵時低於八毫米時，這個卵子就算是順利受精也難以著床。要改善胚胎的著床率，排卵前改善子宮內膜的厚度，要比排卵後使用黃體素來安胎來的有效的多。

子宮是一個外有厚壁，內呈中空的肌肉器官，其位於膀胱(在前方)與直腸(在後方)之間。它可分為兩個部份，即子宮體與子宮頸。測量子宮長度約為 7.5 公分，寬約 5.5 公分，深約 2.5 公分，其壁相當厚，約 1.2 公分，子宮腔則非常的小。子宮體的襯裡是子宮內膜層，屬於一種上皮細胞組織，其中有豐富的腺體及基質的分佈。子宮內膜的表層細胞可隨每次月經週期而增生與剝落，而其基質部位則維持不變。而子宮體的中層是一種肌肉細胞，稱為子宮肌層(myometrium)。子宮體的外層是非常薄的外漿膜(serosa)或稱子宮漿膜(perimetrium)。子宮的功能有下列幾點：

1. 為受精卵準備一個適當著床的空間
2. 在胚胎/胎兒發育成熟之前，可提供保護與營養的功能
3. 在分娩之際能夠使胎兒與胎盤娩出
4. 藉著子宮肌層的肌肉收縮可使胎盤脫落部位不致出血過多，此可稱為是

“自然縫合(living ligatures)”。

子宮內膜可分為基層及功能層。功能層的子宮內膜會隨動情素與黃體素濃度的改變而會產生若干變化。在月經期過後，功能層在動情素的刺激下，自基層處不斷的生長，直到排卵為止，此時期稱為增殖期(proliferative phase)。增殖期中子宮內膜不斷增長，且有微小的血管生長，攜帶充分的血流。當排卵發生，黃體素增加，子宮內膜中的腺體開始作用，分泌黏液、肝醣及某種特殊物質，以助於受精卵的著床滋養，這時期就稱為分泌期(secretory phase)。在沒有懷孕的情況下，黃體有一定的生命期，會自行萎縮且停止荷爾蒙的製造，以致動情素濃度下降，子宮內膜的生長及分泌即會停止。且內膜表層因動脈痙攣而導致局部缺血。細胞因血流供應不足而死亡，以致子宮內膜層出現小量出血，當出血量逐漸增加而使得整個子宮內膜的功能層剝落下來，合著血液一起自陰道排出，即是所謂的月經(menstruation)。

著床定義為：是一種過程，在胚胎接觸到子宮壁，而且穿透並進入上皮細胞和母親循環系統中。這個過程具有時間和空間的限制。受精卵進入子宮內發育成囊胚(blastocyst)，囊胚的胚芽細胞(embryoblast)之對位於子宮壁上皮是很重要的。在囊胚進入子宮 2-3 天尚未接觸子宮上皮細胞之前，子宮壁液體可以溶解囊胚的透明帶使透明帶消失，在第 4 天囊胚附著到子宮內膜上皮之上，開始著床。第 5 天融合滋養層(syncytiotrophoblast)開始侵入內膜上皮與其下的內膜基質。具高度侵蝕力的融合滋養層可能會分泌一些蛋白水解酶(proteolytic enzymes)來穿過並侵蝕子宮內膜的上皮細胞，進而進入含有微血管及腺體的子宮內膜基質(endometrial stroma；一種結締組織)內，囊胚則慢慢地將自己包埋到子宮內膜中。而且子宮內膜也會促進此蛋白水解酶的作用，因此著床是滋養層和子宮內膜共同作用的結果。

Hertig(1968)將融合滋養層描述為“侵蝕性的、攝食性的以及消化

性的(invasive, ingestive and digestive)”。在植床部位周圍的基質細胞會變得具有肝醣脂質，並表現多邊形的外觀，這些細胞稱為蜕膜細胞(decidual cells)，它們有些會在融合滋養層侵入的區域上發生變性(degenerate)。而為胚胎提供了豐富的營養來源。在胚芽細胞著床地方，子宮內基質微血管滲透性會增加，以幫助著床。當更多的滋養層與子宮內膜接觸後，滋養層便開始增生及分化成為兩層：1. 滋養葉內層(cytotrophoblast)，它具有高度的分裂活性，並能形成新細胞轉移到正在增加的融合滋養層質塊上；2. 融合滋養層(syncytiotrophoblast)，它能迅速地形成一大，厚且多核的質塊，其中並無法辨認出有任何的細胞分界存在。轉移到融合滋養層中的滋養葉內層細胞會互相融合並逐漸喪失其細胞膜而形成了融合細胞層(syncytium)；在滋養葉內層中尚能見到有絲分裂的發生，但是在融合滋養層中就無法看到了。

Schlafke 和 Ender s 描述著床滋養層細胞(trophoblast)和子宮上皮細胞之間三種連續性變化。第一個作用，滋養層細胞侵入子宮上皮細胞間，進入基底膜(basal membrane)；第二個作用，是上皮細胞提昇基底膜，為了使滋養層細胞暗中進入細胞內；最後作用，是滋養層細胞和子宮上皮細胞溶合，為使胚胎進入母體內。當胚胎與子宮內膜緊密相接觸時，表面上有扁平和掌狀的微小絨毛存在，位於上皮細胞腔狀表面。在此時期，細胞膜很緊密接觸和形成連合複合體。用生理溶液觸擊子宮，胚胎不再被驅逐出上皮細胞表面。

滋養層細胞具有吞噬各種細胞的能力，但是在活體中，只局限於移除死亡內皮細胞，或是細胞從子宮壁上剝落。而胚胎本身分泌各種不同的蛋白水解酶，主要是消化細胞間基質(matrix) 包含 glycoprotein、elastin 和 collagen (這些都是正常細胞間基質)，使上皮細胞緊緊接在一起。在老鼠胚胎中，試管內可發現 plasminogen 活化

劑，它的作用是非常重要的，在早期著床向外生長特具有意義。而胚胎在著床後期具有消化能力。

在著床早期，著床地方可發現前列腺素濃度增加。兔子的胚芽細胞包含前列腺素，但是在試管中，老鼠胚芽細胞不會產生多量前列腺素。子宮內膜細胞很可能是前列腺素的來源。在著床時組織傷害可能引起前列腺素合成。

Shelesnyak 提出組織胺(histamine)可激發蛻膜反應(decidual response)，他發現在老鼠中，全身性或直接注射抗組織胺可以阻止子宮蛻膜反應。子宮中肥大細胞是組織胺主要來源，這個就是為什麼會增加微血管滲透性和子宮內膜的蛻膜變化。

Decidualization 或 decidual cell reaction(DCR)是發生在有胚胎或雌鼠用人工 deciduogenic 刺激下，子宮內膜的 stromal cell 增生和分化成蛻膜細胞的反應^(1,2,3)。在雌鼠的 traumatic 刺激後 0-8 天中有 DCR⁽⁴⁾，而蛻膜細胞在 DCR 的第 5 天達到最大 size，同時也是增殖最高時期。

在人類未妊娠後期，蛻膜細胞圍繞在血管四周，可是通常不會有大量蛻膜細胞，直到妊娠發生為止。卵巢固醇類控制蛻膜細胞變化，在人類其 estrogen 和 progesterone 濃度是很重要的。豬的胚芽細胞在妊娠第 12 天開始合成 estrogen，是在確定接觸到子宮壁後 6 天。estrogen 可以對腦下垂體產生回饋作用以增進 LH 分泌。而 LH 是維持黃體功能所必須的。

MMPs 的活性、分泌在許多病理過程中都有深入的研究，但是缺少在正常組織的形成和重組中 MMPs 的探討。最近利用 *in situ* hybridization，在蛻膜形成的早期(第六天)胚胎的滋養層細胞可發現 MMP-9 的 transcription⁽⁵⁾，而此 MMP-9 可以幫助胚胎著床期間細胞的侵略行爲，相對地，母體蛻膜細胞會表現 TIMP-3 來限制此侵略行爲只在著床的位置⁽⁶⁾。

除此之外利用 *in situ hybridization* 偵測子宮內膜再生、重組的週期也可發現 matrix metalloproteinase 和 TIMP 的存在⁽⁷⁻¹⁴⁾，如 matrilysin mRNAs 位於表層細胞，其他 MMPs mRNAs 則位於基質細胞⁽⁶⁾。

而 MMPs 成員彼此以協調的方式出現在不同的再生、重組的週期，如 (1) 72 kDa gelatinase 和 TIMP-1 在整個週期中都有 transcripts 表現 (2) stromelysin-1，stromelysin-2，interstitial collagenase 以及 92 kDa gelatinase 只在月經期中有 transcripts⁽¹⁴⁾ (3) matrilysin，stromelysin-3 則是在增殖期中有 transcripts⁽⁶⁾ (4) MMP-7 在產後的子宮中活性增加，而且相對於基質 proteoglycan 分解的速度⁽¹⁵⁾ (5) matrilysin 的活性在月經期中組織的瓦解中有改變⁽¹¹⁾。

然而 MMPs 也在 cell-type，tissue 和再生的 cycle-specific patterns 如排卵⁽¹⁶⁾，胚胎著床⁽¹⁷⁾和乳汁分泌後乳腺退化⁽¹⁸⁾中都有出現活性和表現，而且 MMPs 也受到調控子宮內膜變化週期的卵巢固醇類荷爾蒙的調節⁽¹⁸⁾，如 *in vitro* 中人類子宮內膜的生物活體組織培養，以確知黃體素可以抑制 matrilysin，stromelysin-1 和 stromelysin-3 的蛋白或 RNA，72 kDa gelatinase，92 kDa gelatinase 和 interstitial collagenase 的酵素活性^(12,13)。但是在子宮內膜分泌後期、月經早期時，黃體素下降，子宮內膜的 decidualized stromal cells 會促使 72 kDa gelatinase 的分泌。黃體素在其它組織或細胞中也會抑制 procollagenase 的產生和活化，例如產後老鼠子宮生物活體組織⁽²⁷⁾、組織培養的平滑肌內細胞⁽¹⁹⁾、兔子⁽²⁰⁾和幾內亞豬⁽²¹⁾的子宮頸纖維母細胞和腹膜的巨噬細胞⁽²²⁾。

黃體素抑制子宮內膜主要表現的 MMPs，也可以從 MMPs 的 gene 結構得到證實。如 matrilysin⁽²³⁾和 stromelysin⁽²⁴⁾的 promoters 區域有個相似於 steroid hormone-response elements。再者，glucocorticoids 可以抑制 collagenase 的表現⁽²⁵⁾以及 retinoic acid 可以抑制 stromelysin 的

表現⁽²⁶⁾。而 glucocorticoids，retinoic acid 利用與 steroid hormone receptor 間的交互作用和可認識這些 gene promoters 區域的 AP-1 site 的 factor 來達到抑制的效果。

MMPs 在子宮內膜的分泌期中被抑制，以便胚胎可以著床，然而在月經期早期所有 MMPs 都有大量的 RNA 表現，顯示 MMPs 參與組織的瓦解。因此我們藉由研究假懷孕雌鼠之子宮內膜厚度的變化(蛻膜瘤組織的形成)和 MMP-2 gelatinases 的相關性，企圖在臨床上能夠改善子宮內膜厚度異常所造成的不孕症，同時也將有助於人工受精的發展。

實驗方法

1.動物的處理

- 1) Sprague-Dawley 雌鼠(體重在 180-300 公克)在溫控 24 °C 之環境下，每天照明 12 小時(日光週期為 5:00 AM - 5:00 PM)
- 2)每天檢查其陰道塗抹液，挑選具二次以上規律之四日型動情週期雌鼠
- 3)在動情期當天上午以玻棒插入陰道內，在一分鐘內給予 200 次刺激子宮頸 (cervical stimulation)，刺激當天為假懷孕期第 0 天
- 4)假懷孕期第 4 天，利用乙醚麻醉雌鼠，剖開其腹腔並且將其子宮拉出，以特製長針僅輕刮其一邊子宮壁。另外一邊未刮之子宮為對照組。手術完畢後，縫合並且消毒再放回籠中繼續飼養
- 5)以此假懷孕的第 4 天為子宮蛻膜形成的第 0 天

2.組織的研磨

- 1)於假懷孕第 5、6、9、11 和 13 天分別將雌鼠斷頭犧牲，並且將其子宮取出，稱重

以下實驗皆在 4 °C 上操作

- 2)分別將有受子宮頸刺激(實驗組)和未受子宮頸刺激(對照組)的子宮以利剪分開，並且用玻棒輕輕地將內膜(deciduomata，蛻膜瘤)和外膜(myometrium，子宮基膜)分開
- 3)分別將內、外膜先用 PBS buffer 清洗，再以每 100 mg 組織用 1 ml PBS buffer 的比例加入 PBS buffer 之後，用研磨器(Konetes homogenizer)研磨組織(30 strokes)
- 4)研磨液置於冰上靜置 10 mins 再離心 14,000 xg 30 分鐘

5)取上清液放入-80 °C保存備用

3.進行 zymogram protease assays

實驗方法及步驟同 pp. 13

4.Optimal pH 的測定

以子宮蛻膜瘤形成的第 2 天(deciduomata)當檢體

實驗方法及步驟同 pp. 16

5.蛋白酶抑制劑抑制分析

以子宮蛻膜瘤形成的第 2 天(deciduomata)當檢體

實驗方法及步驟同 pp. 17

6.EDTA 的抑制蛋白酶活性的分析

以子宮蛻膜瘤形成的第 2 天(deciduomata)當檢體

實驗方法及步驟同 pp.18

7.在 0.5 mM EDTA 存在下，不同 Ca^{2+} 濃度對蛋白酶活性的影響分析

以子宮蛻膜瘤形成的第 2 天(deciduomata)當檢體

實驗方法及步驟同 pp. 19

含各種不同 Ca^{2+} 與 EDTA 濃度的組合

CaCl ₂ 最後濃度 (mM)	1 M CaCl ₂ 的用量 (μl)	EDTA (mM)	Tris-HCl, pH8.0 NaN ₃	dH ₂ O
10	50	0	40 mM Tris- HCl , pH8.0 0.01% NaN ₃	加 dH ₂ O 至 5 ml
0	0	0		
0	2.5	0.5		
2	10			
4	20			
8	40			
10	50			
20	100			

8.在 Ca^{2+} 存在下加入不同濃度之 Zn^{2+} 的影響分析

以子宮蛻膜瘤形成的第 2 天(deciduomata)當檢體

實驗方法及步驟同 pp. 21

9.不同的蛋白酶對 zymography 型式(pattern)之影響分析

以子宮蛻膜瘤形成的第 2 天(deciduomata)當檢體

實驗方法及步驟同 pp. 21

female S.D. rats (180-300 g)



vaginal smear test



after 2 estrous cycles



**vagino-cervical vibration
(pseudopregnancy induction)**



after 4 days

**trauma stimulation
(decidualization induction)**



decidual growth

The pathway of decidualization induction

實驗結果

一、雌鼠的陰道抹片檢查

藉由觀察雌鼠陰道的細胞型態，來判定其生理週期是否正常，進而選擇至少有二次以上連續的正常週期之雌鼠作假懷孕的實驗。一般雌鼠的生理週期為四天：

1. P：動情前期，陰道的細胞呈現卵圓形或紡錘形，可見細胞核
2. E：動情期，陰道的細胞呈現極不規則、扁平角化，且有很多殘餘的上皮細胞
3. M：動情後期，陰道的細胞呈現角化，並有白血球浸潤其間
4. D：動情間期，陰道的細胞很少，但有很多白血球

在雌鼠的動情期用玻棒插入陰道內震動，以刺激子宮頸產生假懷孕狀態(刺激當天為假懷孕的第0天)，以便觀察子宮內膜以及 MMP-2 在假懷孕情況下的變化。(圖一)

二、雌鼠的二個子宮實景

在假懷孕的第四天，藉由刮傷這個動作來代替胚胎的著床。結果有刮傷的子宮比無刮傷的子宮(對照組)變大許多。為了確定這個變大是由於細胞的增殖所造成的或是只是細胞受傷(刮傷)所造成的腫大，因此進行下面的分析。(圖二)

三、假懷孕子宮在刮傷刺激後重量的變化

我們觀察假懷孕且受刮傷刺激後的第0、1、2、3、5、7、9天子宮重量的變化，結果發現子宮的重量在增加，到第7天達到高峰而在第9天重量就有明顯的下降。(圖三)

四、子宮蛻膜瘤細胞的細胞分裂情況

我們進而觀察這幾天子宮蛻膜瘤的細胞，結果觀察到有細胞分裂的情形，因此將這些結果做成柱狀圖，從柱狀圖得知在刮傷刺激後的第3天細胞分裂的現象最多，而在第5天細胞分裂趨於緩慢，到了第9天幾無細胞分裂出現(圖四)。這個結果顯示為第7天的子宮重量最重的原因(圖三)以及子宮是因細胞增殖和細胞腫大才造成變大(圖二)。

五、子宮在蛻膜瘤組織成長周期時的變化

從圖五的第0天可以看到子宮的二個部份：外面是外膜組織，裡面是內膜組織。隨著內膜組織細胞不斷的分裂增殖，使的內膜組織的厚度也隨著增加，進而使內膜組織的中空部份變得越來越小，到了第9天內膜組織幾乎要整個與外膜組織脫離，而排出。

六、子宮蛻膜瘤中的 gelatinase 變化

由 Zymography 的分析，蛻膜(deciduomata)和外膜(myometrium)主要出現三種蛋白酶 92、72 和 62 kd gelatinases(圖六)。將電泳的結果做成曲線圖，可以清楚的看到：(1) 92 kd gelatinase 的活性在蛻膜和外膜中的變化情況相近，皆是先下降到第5天再緩慢上升，而在第7天又下降，但是在第9天 92 kd gelatinase 的活性又突然在蛻膜中上升許多(圖八)。(2) 72 kd gelatinase 的活性在蛻膜和外膜中有著明顯的差異。在第3天的蛻膜中 72 kd gelatinase 的活性開始下降，至第5天幾乎快要沒有活性，但後來活性又恢復和第3天差不多。而外膜中的 72 kd gelatinase 活性則是不斷上升，至第5天達到高峰而後第7、9天下降一些並且趨於平穩(圖九)。(3) 至於 62 kd

gelatinase 在蛻膜和外膜中的活性則是在第 2 天達到高峰，之後便下降。但是蛻膜的下降斜率較大，在第 5 天活性降至最低後再緩慢上升；而外膜卻是第 3、5 天活性相近，到了第 7 天突然下降許多，在第 9 天又上升不少(圖十)。(4) 由於 62、72 kd gelatinase 分別屬於 MMP-2 的不活化態和活化態，所以想要了解 MMP-2 的活化率情況，因此將 62 kd / 62 + 72 kd gelatinase 的 ration 做成圖表。結果活化率在蛻膜和外膜中有著相似的變化情形，二者的活化率在第 2 天達到高峰之後便下降，其中又以外膜在第 5 天幾乎沒有活化率；但是到了第 7、9 天二者的活化率又上升，其中又以外膜的活化率變化最大(圖十一)。

七、比較乳癌、fibroadenoma 和子宮內的 gelatinase

利用已知的乳癌中 62、72 和 92 kd gelatinase 的分子量與子宮內的 gelatinases 比對，結果在子宮內的三種 gelatinases 分子量與乳癌中的 62、72 和 92 kd gelatinase 在電泳上的位置差不多。(圖七)

八、子宮蛻膜中 62、72 kd gelatinase optimal pH 值的測定

爲了了解 62、72 kd gelatinase 在何種 pH 值下會有最大的活性值，因此利用各種不同 pH 值的緩衝液做反應。結果得知：62、72 kd gelatinases 的活性出現在 pH 7-8 中，且皆以 pH 7 活性最大。(圖十二)

九、蛋白酶抑制劑抑制子宮蛻膜中之 62、72 kd gelatinase 活性的分析

藉由各種蛋白酶抑制劑的抑制效果，可以了解 62、72 kd gelatinase 是屬於那一類的蛋白酶。62、72 kd gelatinase 在加入蛋

白酶抑制劑後，受到 TPCK 和 DFP 的部份抑制，而以 EDTA 幾乎完全抑制活性，可知其為 metalloproteinase。(圖十三)

十、EDTA 抑制子宮蛻膜中之 62、72 kd gelatinase 活性的分析

由蛋白酶抑制劑抑制子宮蛻膜中之 62、72 kd gelatinase 活性分析(圖十三)，知道 62、72 kd gelatinase 皆為 metalloproteinases，故需要二價陽離子當 cofactor 才会有活性，因此為了探討何種二價陽離子可作為這些 gelatinases 的 cofactor，所以需要先了解在何種濃度之下，EDTA 可以將研磨液本身存有的二價陽離子抓完，以便一加二價陽離子就可恢復 gelatinase 的活性，進而知道該二價陽離子可以作為 gelatinase 的 cofactor。結果顯示反應液中只要有 0.5 mM 的 EDTA 存在，就可以使這些 gelatinases 無活性。(圖十四)

十一、在 0.5 mM EDTA 存在下，不同 Ca^{2+} 濃度對子宮蛻膜中之 72、62 kd gelatinase 活性的影響分析

在圖十四中得知只要 0.5 mM 的 EDTA 存在，72、62 kd gelatinase 就無活性，因此將進一步的探討需要多少的 Ca^{2+} 才能恢復 72、62 kd gelatinase 的活性。結果在 2 mM Ca^{2+} 存在下，可以恢復 62 kd gelatinase 的活性，但是 72 kd gelatinase 則是要在 4 mM Ca^{2+} 時才能恢復活性，並且二者隨著 Ca^{2+} 濃度上升活性隨之緩慢上升且成平穩狀態，然而二者的活性卻不能再恢復成原先的程度(未加 EDTA 並且存在有 10 mM Ca^{2+})。而且 62 kd gelatinase 在 Ca^{2+} 8 mM 時活性突然下降一些，但是在 Ca^{2+} 10 mM 時活性又上升。由此可知 72、62 kd gelatinase 為 Ca^{2+} -dependent。(圖十五)

十二、在 Ca^{2+} 存在下，不同濃度的 Zn^{2+} 對於子宮蛻膜中之 72、62 kd gelatinase 活性之影響分析

由於先前的報告指出 MMP-2 的 domain 上有 Zn^{2+} 的 binding site，然而在不同二價離子恢復 72、62 kd gelatinase 活性的實驗中 Zn^{2+} 不能恢復 gelatinases 的活性(data not shown)，但是在另一份研究中指出在 Ca^{2+} 以及少量的 Zn^{2+} 存在下 gelatinase 具有活性。由於 Zn^{2+} 和細胞的增殖有關連性，故藉由 Zn^{2+} 濃度變化來了解 Zn^{2+} 對 72、62 kd gelatinase 活性的影響。由圖十六知道：62、72 kd gelatinase 在 0.2 和 0.4 mM 的 Zn^{2+} 存在下有活性出現，並且其出現的最大活性分別在 0.2 和 0.4 mM，而所恢復的最大值活性也接近原先的活性(未加 EDTA 同時有 10 mM Ca^{2+} 存在，Lane 1)，但是繼續提高 Zn^{2+} 濃度反而使這二個 gelatinases 失去活性，可能是過多的 Zn^{2+} 對於 gelatinases 有回饋抑制的效果(圖十六)。

十三、不同的蛋白酶活化子宮蛻膜研磨液的分析

已知有許多的蛋白酶以及 MMP family 的成員分別是以 proproteinase form 和 zymogen form 存在細胞質中，需要其它的蛋白酶將其作進一步的切割，才會具有活性。因此利用各種不同的蛋白酶處理子宮蛻膜研磨液，檢視是否會對 62、72 kd gelatinase 造成影響或誘發新的其它蛋白酶。結果經 trypsin 處理似乎增加 62、72 kd gelatinases 2 倍的活性。而經 thermolysin 處理似乎只增加了 2 倍的 62 kd gelatinase 活性。但是經 chymotrypsin、nargase、proteinase K (後二者的 data not shown) 處理則沒有什麼改變。(圖十七)

討 論

利用子宮頸刺激造成假懷孕狀態後，再在第 4 天用刮傷刺激誘發蛻膜瘤組織的增生。蛻膜瘤組織的發展週期為 8 天，在第 9 天時子宮內膜呈現剝離狀態，行將被排出。因此觀察刮傷刺激後的第 0、1、2、3、5、7、9 天中子宮蛻膜和 gelatinases 的變化。結果顯示子宮蛻膜細胞不斷在增殖，其中以第 3 天的細胞分裂數目最多，第 5 天減緩，而已知的蛻膜瘤組織在第 5 天的 site 最大，因此使得子宮的重量在第 7 天達到最重。

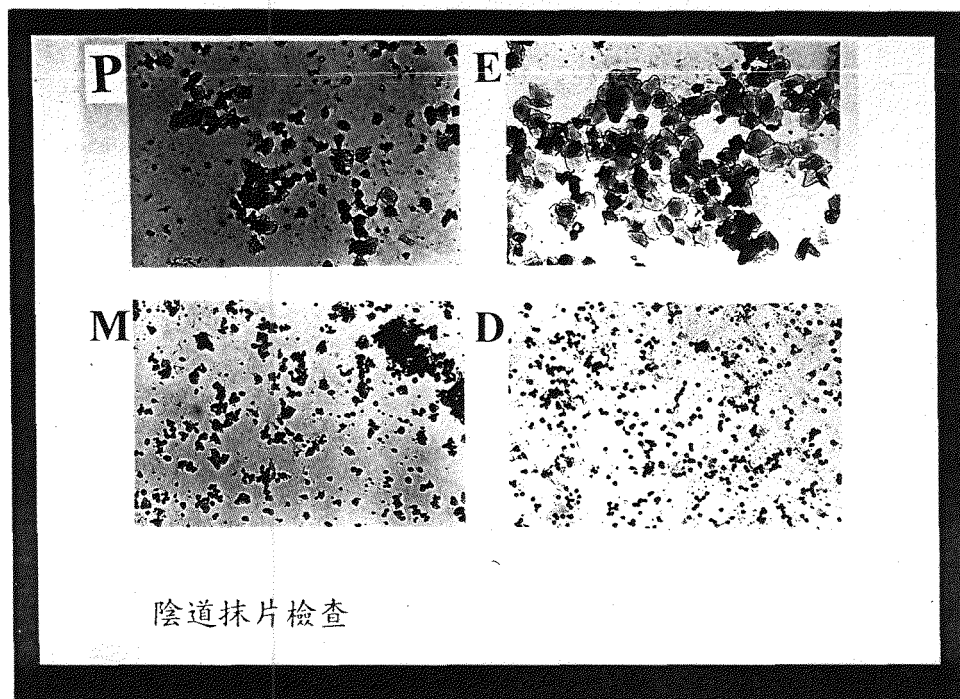
在這 10 天蛻膜瘤組織增殖的狀態中，出現三種較特殊的蛋白酶，經由與已知的乳癌組織中之 62、72 和 92 kd gelatinases 的電泳位置比對相同後，得知為 62、72 和 92 kd gelatinases。而且不管是在子宮蛻膜或子宮外膜組織中，這三種 gelatinases 的活性都高於未被刮傷刺激的對照組，而且藉由 gelatinase 活性的量化結果分析，發現在第 9 天時，子宮蛻膜中之 92 kd gelatinase 的活性突然上升 5 倍，而在子宮外膜的 92 kd gelatinase 活性則保持平穩狀態，然而此時的子宮內膜將要被排出體外，這個結果符合已知 MMP-9 參與月經週期中組織的瓦解。72 kd gelatinase 因受到黃體素的抑制，所以 72 kd gelatinase 在子宮蛻膜形成中的活性低於在子宮外膜(沒有黃體素的調控)中的活性，但是到了後二天因子宮內膜要被排出(黃體素應該可能下降)，所以 72 kd gelatinase 活性才會上升。至於第二天的活性上升，應該是子宮外膜的酵素活性(因第一、二天的子宮蛻膜和子宮外膜並沒有分開)，而非真正 72 kd gelatinase 在子宮蛻膜中的活性。至於 62 kd gelatinase 的活性並沒有受黃體素抑制，而且在子宮蛻膜形成中活性上升，由此可推測 62 kd gelatinase 的活性會造成子宮內膜的增殖。

而對 62 和 72 kd gelatinase 做進一步的分析，二者在 pH 7 時有最

大的活性，受 EDTA 抑制活性，由此可知是為 metalloproteinase 且經由各種不同的二價離子實驗，得知為 Ca^{2+} -dependent 的蛋白酶，然而有趣的是在少量 Zn^{2+} 和 Ca^{2+} 存在下會恢復受 EDTA 所抑制的活性，且恢復的活性幾乎同原先未受 EDTA 抑制的情況，但是在多量且無 Ca^{2+} 情況下卻不能，即使在高量只有 Ca^{2+} 存在下也不能恢復至如此，由此可知 62 和 72 kd gelatinase 需要 Zn^{2+} 和 Ca^{2+} ，而這也似乎說明在細胞增殖過程下 Zn^{2+} 大量存在的相關性。

另外用 thermolysin 處理蛻膜瘤組織的研磨液，發現這酵素似乎可以增加 2 倍 62 kd gelatinase 的活性。至於 trypsin 則是會增加這二者 2 倍的活性，而經 chymotrypsin、nargase 和 proteinase K 處理則無任何改變。

圖表與圖表說明



圖一、雌鼠的陰道抹片檢查

雌鼠的生理週期為四天，選擇週期正常至少二次以上的雌鼠，在其動情期時以玻棒插入陰道內震動，刺激子宮頸產生假懷孕狀態，以便觀察子宮內膜以及 MMP-2 在假懷孕狀態中受刮傷刺激後的變化。

P：動情前期

E：動情期

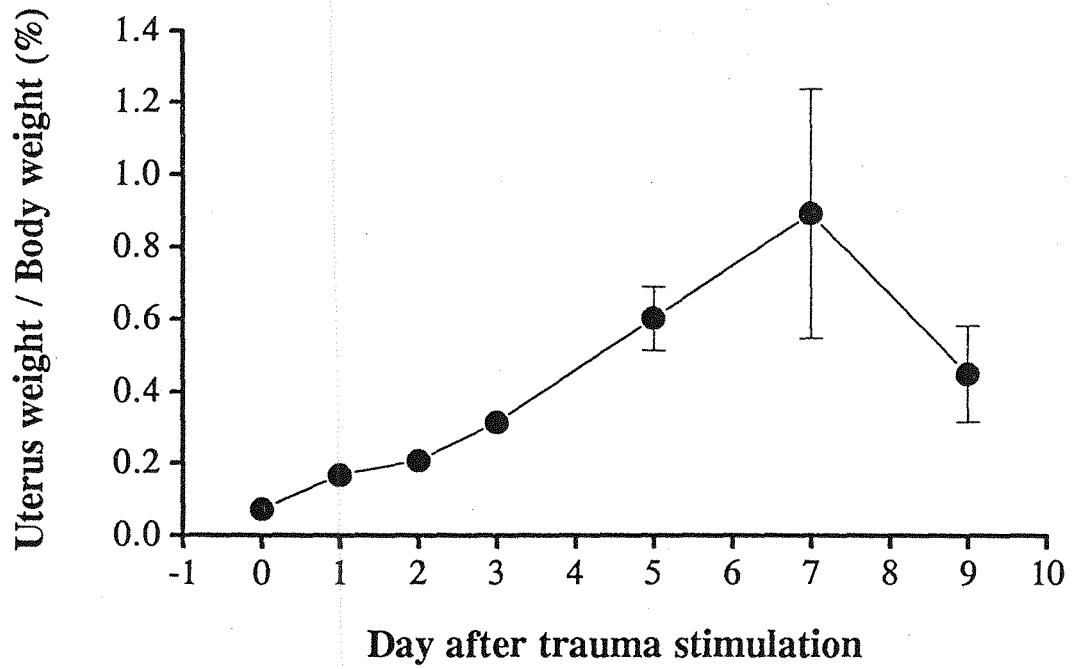
M：動情後期

D：動情間期

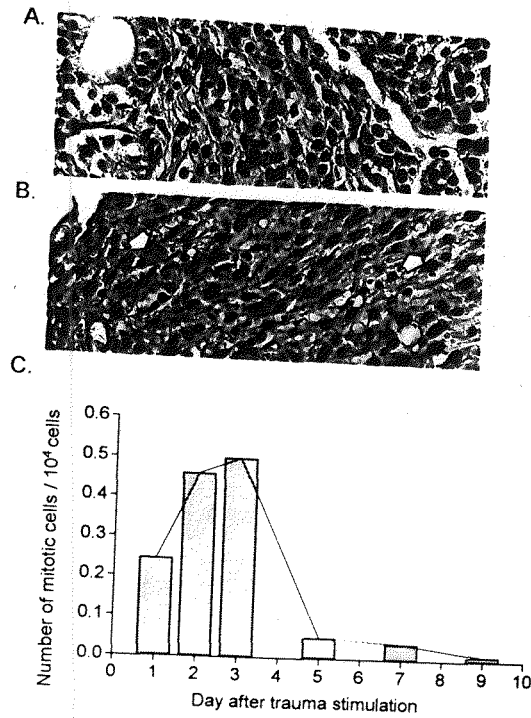


圖二、在假懷孕鼠受刮傷刺激後的第五天之正常子宮(左邊)與刮傷刺激子宮(右邊)的實景

一隻雌鼠有二個子宮，正常子宮當作對照組，而另一個正常子宮利用長針頭輕刮子宮壁的一邊，使此子宮呈現著床狀態



圖三、受刮傷刺激後 (著床狀態)的子宮重量變化曲線圖

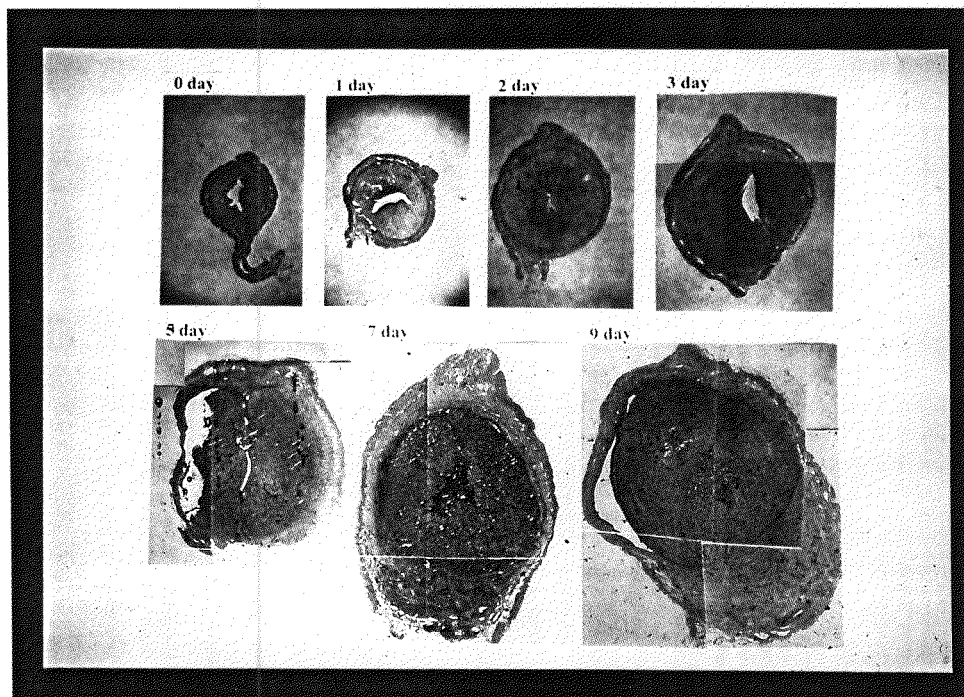


圖四、受刮傷刺激後(著床狀態)的子宮蛻膜瘤細胞之細胞分裂情況

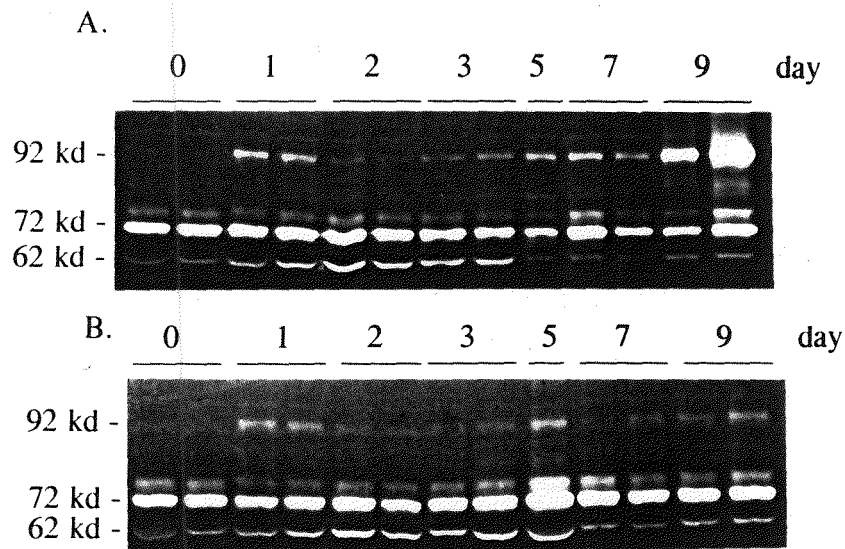
A 圖：正常子宮的子宮內膜細胞

B 圖：著床狀態的子宮蛻膜瘤細胞。白箭頭指出正在分裂的細胞

C 圖：受刮傷刺激後的子宮蛻膜瘤細胞之細胞分裂數目的變化曲線圖



圖五、觀察受刮傷刺激後(著床狀態)的子宮第0、1、2、3、5、
7、9天變化的情況
每天所拍的照片倍數不同

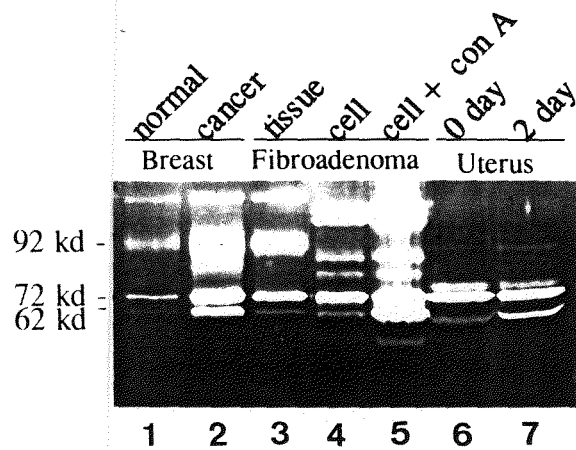


圖六、受刮傷刺激後的子宮蛻膜瘤中之蛋白酶變化

分別取子宮的蛻膜和外膜的細胞研磨液以 zymography 分析蛋白酶

A 圖：子宮蛻膜中 92、72 和 62 kd 蛋白酶的變化

B 圖：子宮外膜中 92、72 和 62 kd 蛋白酶的變化



圖七、比較乳癌、fibroadenoma 和子宮內的蛋白酶

利用已知的乳癌中 72 和 62 kd 蛋白酶的分子量比較在子宮中的蛋白酶分子量

Lane 1 : 正常的乳房組織

Lane 2 : 乳癌細胞

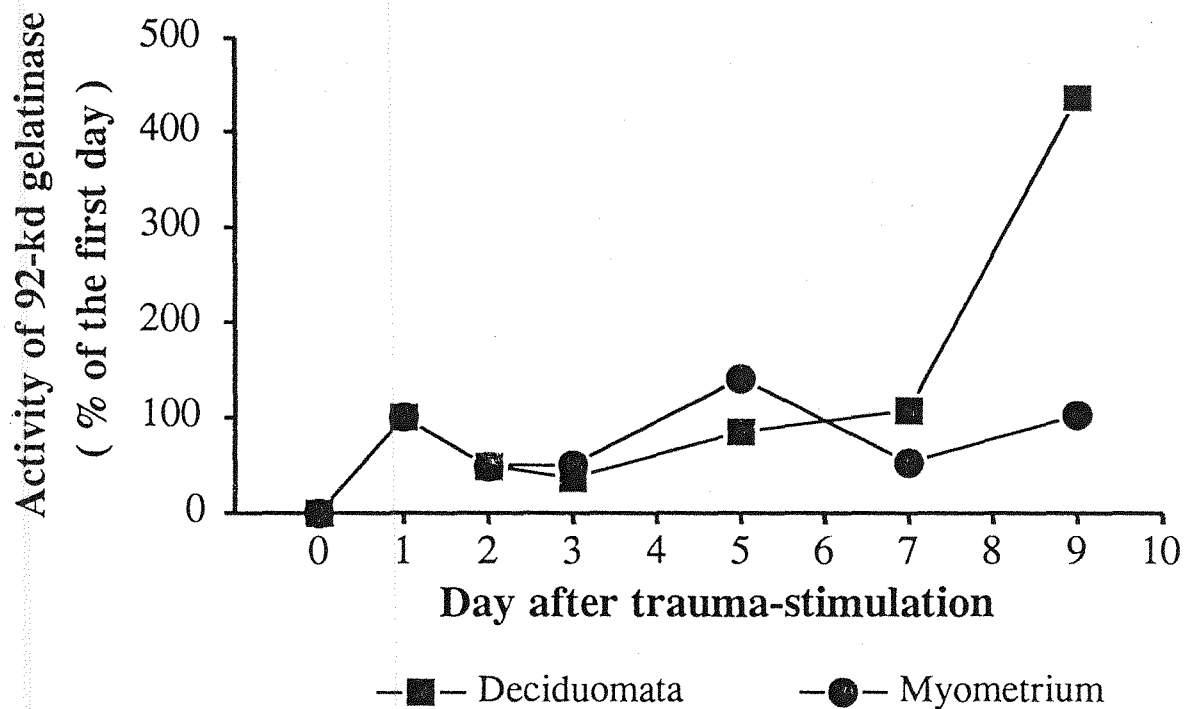
Lane 3 : fibroadenoma 的組織

Lane 4 : 經過培養的 fibroadenoma 細胞

Lane 5 : 在培養的 fibroadenoma 細胞培養液中加入 con A 處理

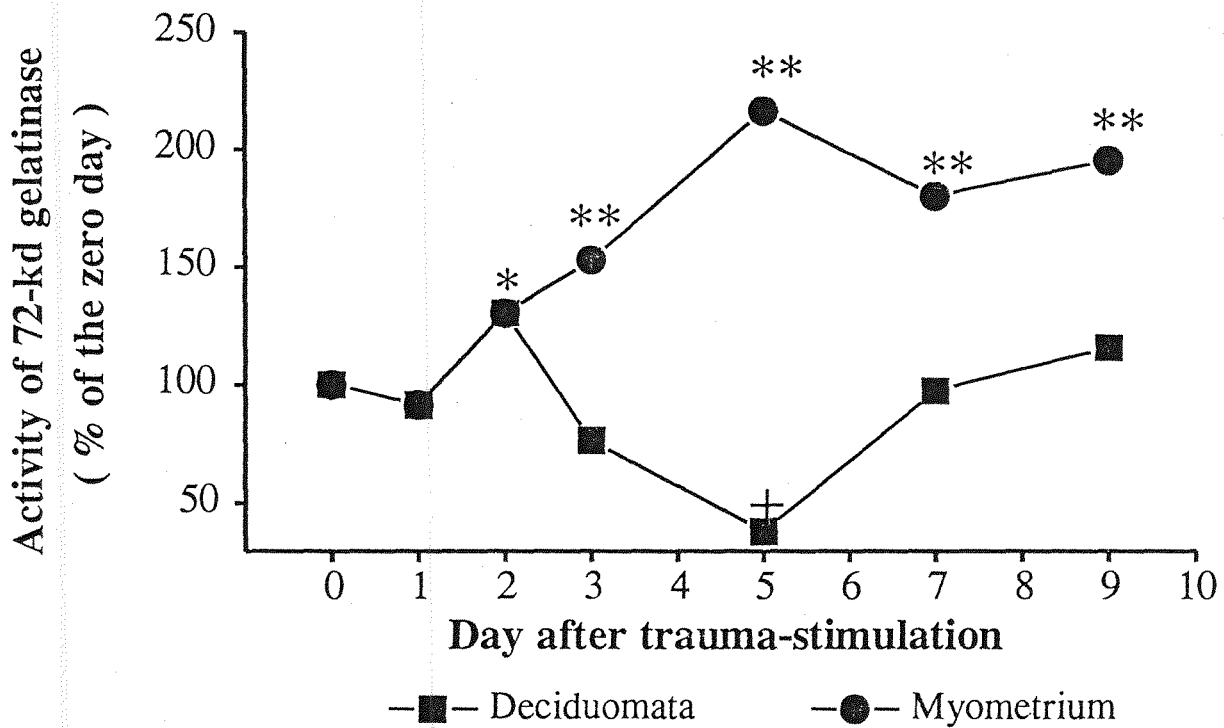
Lane 6 : 受刮傷刺激當天的子宮組織

Lane 7 : 受刮傷刺激第 2 天的子宮組織



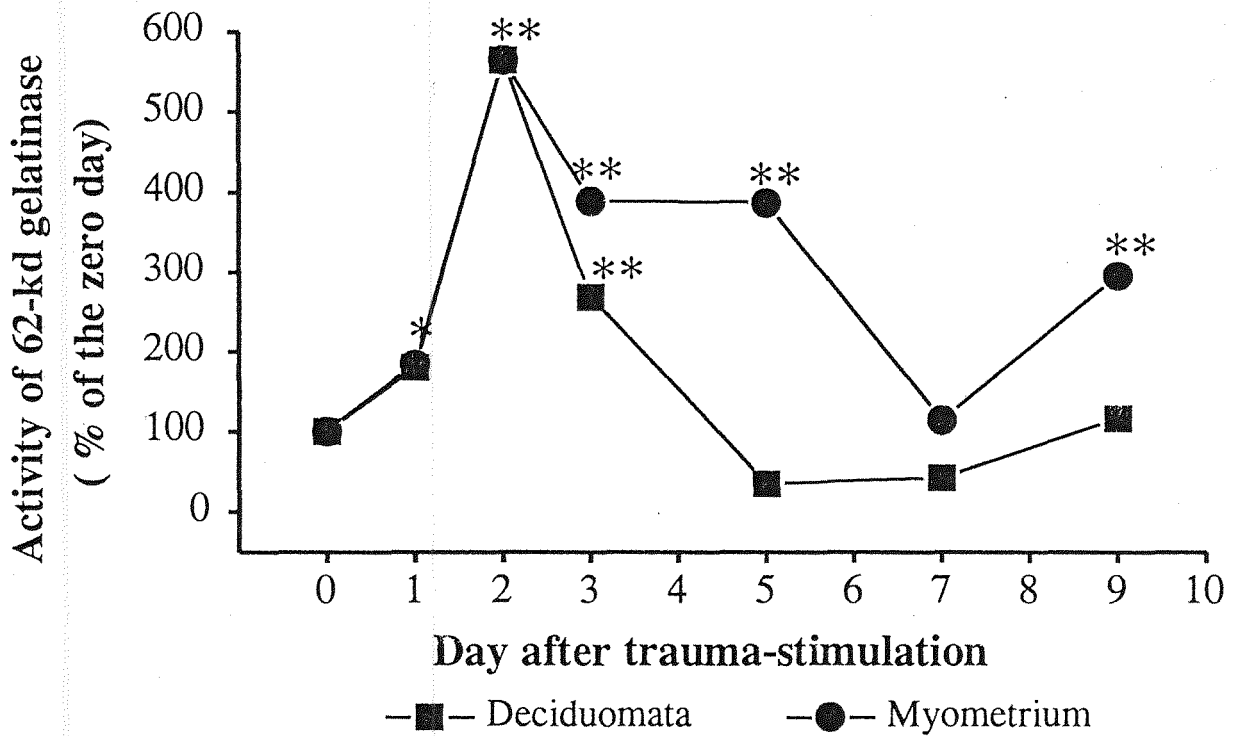
圖八、受刮傷刺激後的子宮中蜕膜(deciduomata)和外膜(myometrium)之 92 kd 蛋白酶變化

利用圖六的電泳結果以 AlphaImager 2000,測二次 92 kd 蛋白酶的活性值、再將這二次的活性值平均求平均值。因 92 kd 蛋白酶的活性沒有在第 0 天出現,故以第一天的活性值為基準,計算 activity of 92 kd gelatinase 的方式:每天所表現的 92 kd 蛋白酶平均活性值/第一天 92 kd 蛋白酶平均活性值



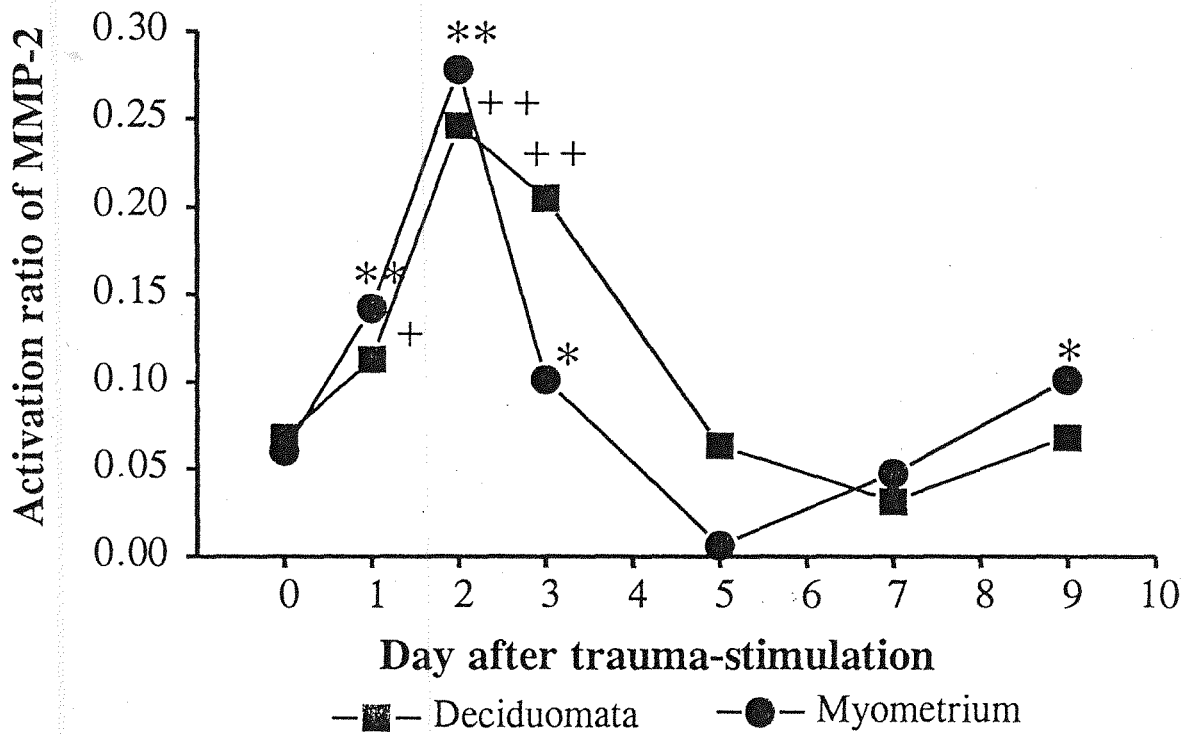
圖九、受刮傷刺激後的子宮中蜕膜(deciduomata)和外膜(myometrium)之 72 kd 蛋白酶變化

利用圖六的電泳結果以 Alphamager 2000,測二次 72 kd 蛋白酶的活性值、再將這二次的活性值平均求平均值。以第 0 天的活性值為基準，計算 activity of 72 kd gelatinase 的方式：每天所表現的 72 kd 蛋白酶平均活性值/第 0 天 72 kd 蛋白酶平均活性值



圖十、受刮傷刺激後的子宮中蜕膜(deciduomata)和外膜(myometrium)之 62 kd 蛋白酶變化

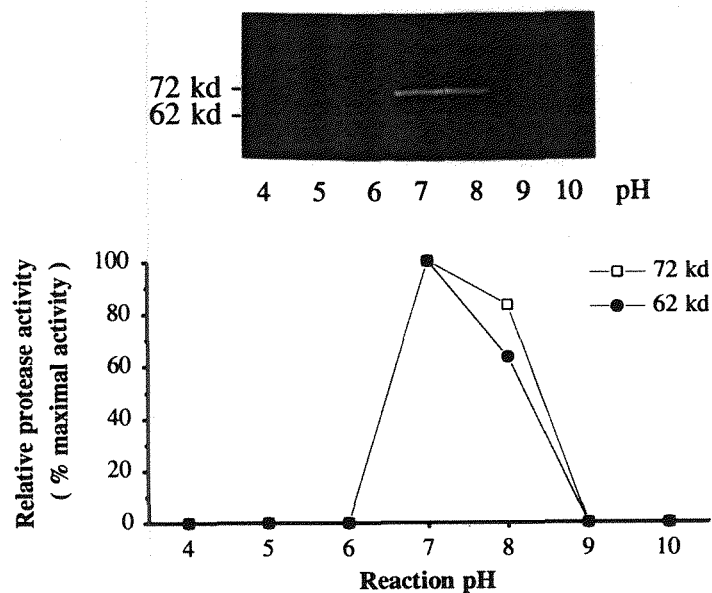
利用圖六的電泳結果以 AlphaImager 2000,測二次 62 kd 蛋白酶的活性值、再將這二次的活性值平均求平均值。以第 0 天的活性值為基準，計算 activity of 62 kd gelatinase 的方式：每天所表現的 62 kd 蛋白酶平均活性值/第 0 天 62 kd 蛋白酶平均活性值



圖十一、受刮傷刺激後的子宮中蜕膜 (deciduomata)和外膜 (myometrium)之 MMP-2 蛋白酶變化

72 kd 和 62 kd 蛋白酶分別為 MMP-2 的不活化態和活化態。而 activation ration of MMP-2 的計算方式為：

62 kd 的蛋白酶平均活性值 / (72 kd + 62 kd)的蛋白酶平均活性值

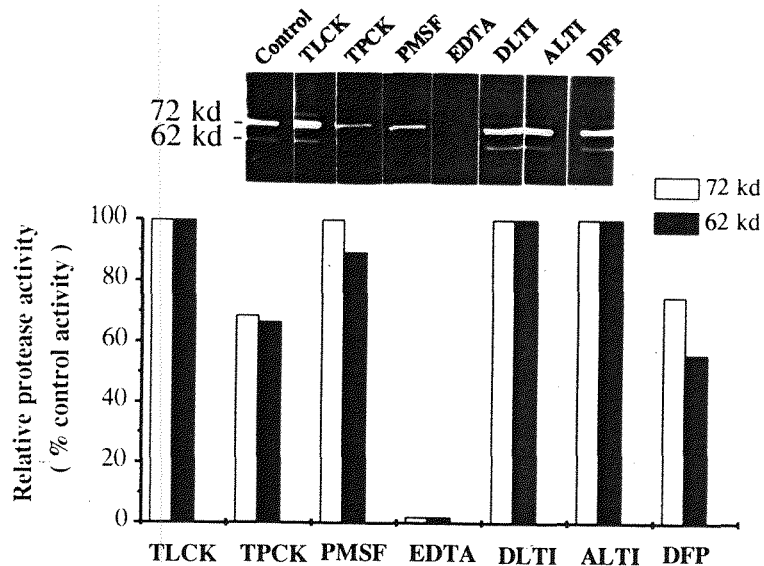


圖十二、子宮蛻膜中的蛋白酶之 Optimal pH 值的測定

利用各種不同 pH 值的緩衝液，分析 72、62 kd 蛋白酶活性的 pH 值範圍

A 圖：電泳的結果

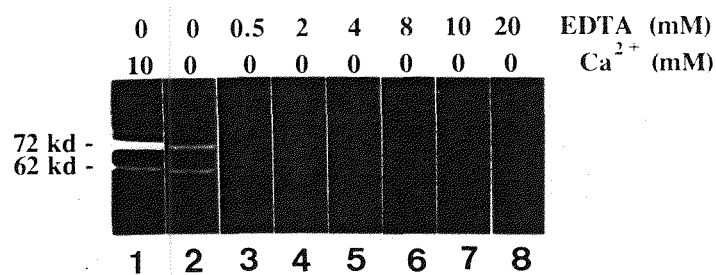
B 圖：將電泳的結果利用 AlphaImager 2000，測每個蛋白酶的活性值。計算的方式以 72 kd 蛋白酶為例：取其中最高的活性值當作 100%，而剩下的不同 pH 值的活性值再與之計算相對的百分比，如：不同 pH 值的活性值/最高的活性值 X 100 %



圖十三、蛋白酶抑制劑抑制子宮蛻膜中之 72、62 kd 蛋白酶活性的分析

可以了解 72、62 kd 蛋白酶是屬於那一類蛋白酶。子宮蛻膜部份之研磨液先進行電泳後，再分別加入不同的蛋白酶抑制反應

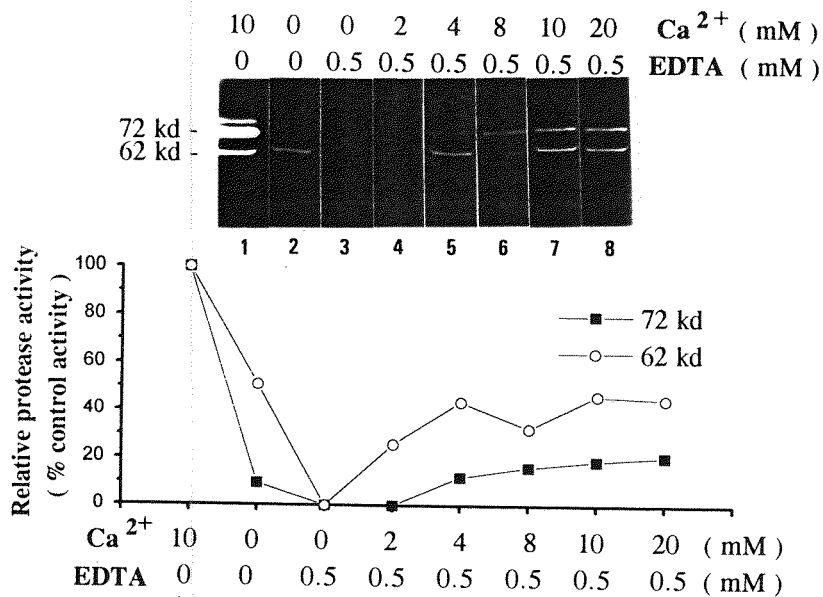
A 圖：電泳的結果；B 圖：電泳的結果利用 AlphaImager 2000, 測定每個蛋白酶被抑制後的活性值。計算的方式以 72 kd 蛋白酶為例：以 control 的 72 kd 蛋白酶活性值為 100%，如：TLCK 抑制後的 72 kd 蛋白酶活性值 / control 的 72 kd 蛋白酶活性值 X 100%



圖十四、EDTA 抑制子宮蛻膜中之 72、62 kd 蛋白酶活性的分析
 由蛋白酶抑制劑抑制子宮蛻膜中之 72、62 kd 蛋白酶活性的分析，
 得知 72、62 kd 蛋白酶受 EDTA 所抑制，故兩者屬於 metalloprotease。
 因此欲進一步了解，EDTA 在何種濃度之下就可以達到抑制的效果

Lane 1：當 control 組

Lane 2、3、4、5、6、7、8：當實驗組

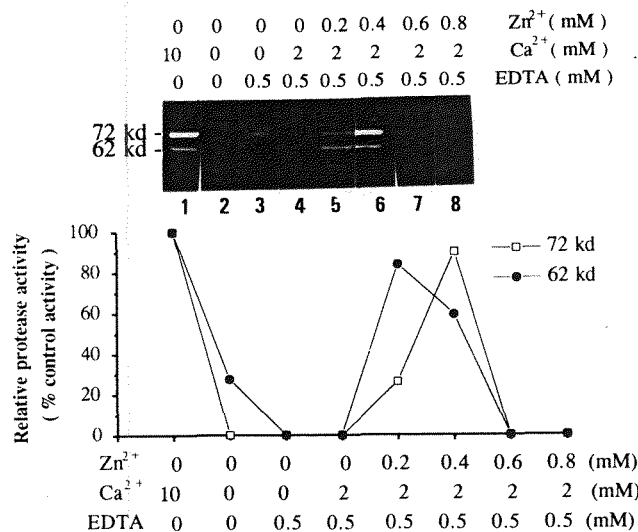


圖十五、在 0.5 mM EDTA 存在下，不同 Ca²⁺ 濃度對子宮蛻膜中之 72、62 kd 蛋白酶活性的影響分析

在圖十三中可知 EDTA 只要 0.5 mM 就可以抑制 72、62 kd 蛋白酶的活性，由於 72、62 kd 為 Ca²⁺-dependent 蛋白酶，因此欲進一步了解 Ca²⁺ 恢復 72、62 kd 蛋白酶活性的能力

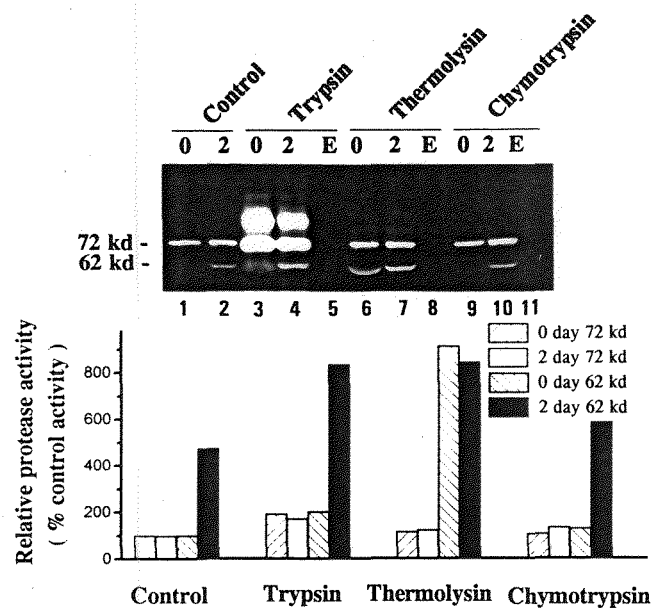
A 圖、電泳結果。Lane 1：當 control 組(一般蛋白酶特徵研究的條件)
Lane 2、3、4、5、6、7、8：當實驗組

B 圖、為電泳結果的曲線圖。將電泳的結果以 AlphaImager 2000, 測 72、62 kd 蛋白酶的活性值，。計算的方式以 72 kd 蛋白酶為例：以 control 的 72 kd 蛋白酶活性值為 100%，如：實驗組的 72 kd 蛋白酶活性值/control 的 72 kd 蛋白酶活性值 X 100%



圖十六、在 Ca²⁺ 存在下，不同濃度的 Zn²⁺ 對於子宮蛻膜中之 72、62 kd 蛋白酶活性之影響分析

由圖十三中可知 EDTA 只要 0.5 mM 就可以抑制 72、62 kd 蛋白酶活性，而 2 mM 的 Ca²⁺ 可抵消 EDTA 對於 62 kd 蛋白酶的抑制，然無法抵消 72 kd 蛋白酶的抑制，先前的報告指出 MMP-2 的 domain 上有 Zn²⁺ 的 binding site。故藉由 Zn²⁺ 濃度變化來了解 Zn²⁺ 對 72、62 kd 蛋白酶活性的影響。A 圖：電泳結果。Lane 1：當 control 組(一般蛋白酶特徵研究的條件)；Lane 2、3、4、5、6、7、8：當實驗組 B 圖、為電泳結果的曲線圖。將電泳的結果以 AlphaImager 2000, 測 72、62 kd 蛋白酶的活性值，。計算的方式以 72 kd 蛋白酶為例：以 control 的 72 kd 蛋白酶活性值為 100%，如：實驗組的 72 kd 蛋白酶活性值/ control 的 72 kd 蛋白酶活性值 X 100%



圖十七、不同的蛋白酶活化子宫蜕膜研磨液的分析

A 圖：電泳結果

Lane 1、2：子宫蜕膜研磨液未加蛋白酶活化，作為 control 組

Lane 3、4；6、7；9、10：子宫蜕膜研磨液分別加 trypsin、thermolysin、chymotrypsin 活化

Lane 5、8、11：分別只有 trypsin、thermolysin、chymotrypsin

B 圖：電泳結果的柱狀圖

將電泳的結果以 AlphaImager 2000,測 72、62 kd 蛋白酶的活性值。計算的方式以 72 kd 蛋白酶為例：以 control 的第 0 天之 72 kd 蛋白酶活性值為 100%，如：

以各種不同的蛋白酶活化子宫蜕膜研磨液後的 72 kd 蛋白酶活性值/control 的第 0 天之 72 kd 蛋白酶活性值 X 100%

0：子宫刮傷的當天 2：子宫刮傷的第 2 天

E：蛋白酶 (因分子量較小，未在圖表現範圍內)

1. Finn Ca. (1971) Biology of decidual cells. in: Bishop MWH (ed). *Advances in Reproductive Physiology*. Vol. 5. London: Logos Press. pp 1-26.
2. Finn Ca. (1977) The implantation reaction. In: Wynn RM (ed.). *Biology of Uterus*. New York: Plenum Press. pp 245-308.
3. Psychoyos A. (1973) Endocrine control of egg implantation. In: Greep RO. Astwood EG. Geiger SR (eds.). *Handbook of physiology*. Section 7. Vol. 2, Part 2. Bethesda, MD: American Physiological Society. pp 187-215.
4. Talley, D. J., Tobert, J. A., Jr. E., Armstrong, G. and Villee, C. A. (1977) Changes in estrogen receptor levels during deciduomata development in the pseudopregnant rat. *Endocrinology*. 101, 1538-1544.
5. Leco, K. J., Edwards, D. R., Schultz, G. A. (1996) Tissue inhibitor of metalloproteinases-3 is the major metalloproteinase inhibitor in the decidualizing murine uterus. *Mol Reprod Dev*. 45 (4), 458-465.
6. William, H. R., Lynn, M. M., Linda, C. G., Beth, D., Paul, C., Chris, S., Fred, G. (1994) Patterns of matrix metalloproteinase expression in cycling endometrium imply differential functions and regulation by steroid hormones. *J. Clin. Invest*. 94, 946-953.
7. Birkedal-Hansen, H., Moore, W., Bodden, M., Windsor, L., Birkedal-Hansen, B. and Engler, J. (1993) Matrix metalloproteinase: a review. *Oral Biology and Medicine*, 4, 197-250.
8. Jr, J. (1991) Matrix metalloproteinase and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB* .5, 2145-2154.
9. Alexander, C. and Werb, Z. (1991) Extracellular matrix degradation. in *Cell biology of the extracellular matrix*. E, Hay. editor. Plenum Publishing. New York. 255-302.

10. Matrisian, L. (1992) The matrix degrading metalloproteinases. *Bioessays*. 14, 455-459.
11. Rodgers, W. H., Osteen, K. G., Matrisian, L. M., Navre, M., Giudice, L. C., and Gorstein, F. G. (1993) Expression and localization of matrilysin, a matrix metalloproteinase, in human endometrium during the reproductive cycle. *J. Obstet. Gynecol.* 168, 9413-9417.
12. Martelli, M., Campana, A. and Bischof, P. (1993) Secretion of matrix metalloproteinases by human endometrial cells in vitro. *J. Reprod. Fertil.* 98, 67-76.
13. Marbaix, E., Donnez, J., Courtoy, P. and Eeckhout, Y. (1992) Progesterone regulates the activity of collagenase and related gelatinases A and B in human endometrial explants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89, 11789-11793.
14. Woessner, J. and Taplin, C. (1988) Purification and properties of a small latent matrix metalloproteinase of the rat uterus. *J. Biol. Chem.* 263, 16918-16925.
15. Sellers, A. and Woessner, J. F., (1980) The extraction of a neutral metalloproteinase from the involuting rat uterus, and its action on cartilage proteoglycan. *Biochem. J.* 189, 521.
16. Curry, T., Mann, J., Huang, M. and Keeble, S. (1992) Gelatinase and proteoglycanase activity during the periovulatory period in the rat. *Biol. Reprod.* 46, 256-264.
17. Llbrach, C. L., Werb, Z., Fitzgerald, M. L., Chiu, K., Corwin, N. M., Esteves, R. A., Grobelyny, D., Galardy, R., Damsky, C. H. and Fisher, S. J. (1991) 92-kD type IV collagenase mediates invasion of human cytotrophoblasts. *J. Cell Biol.* 113, 437-449.

18. Lefebvre, O., Wolf, C., Limacher, J., Hutin, P., Wendling, C., LeMeur, M., Basset, P. and Rio, M. (1992) The breast cancer-associated stromelysin-3 gene is expressed during mouse mammary gland apoptosis. *J. Cell Biol.* 119, 997-1002.
19. Jeffrey, J. J., Roswit, W. T. and Ehlich, L. S. (1990) Regulation of collagenase production by steroids in uterine smooth muscle cells: an enzymatic and immunologic study. *J. Cell. Physiol.* 143, 396-403.
20. Sato, T., Ito, A., Mori, Y., Yamashita, K., Hayakawa, T. and Nagase, H. (1991) Hormonal regulation of collagenolysis in uterine cervical fibroblasts. Modulation of synthesis of procollagenase, prostromelysin and tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) by progesterone and oestradiol-17 beta. *Biochem. J.* 275, 645-650.
21. Rajabi, M., Solomon, S. and Poole, A. R. (1991) Hormonal regulation of interstitial collagenase in the uterine cervix of the pregnant guinea pig. *Endocrinology.* 128, 863-871.
22. Wahl, L. M. (1977) Hormonal regulation of macrophage collagenase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 74, 838-845.
23. Gaire, M., Magbanua, Z., McDonnell, S., McNeil, L., Lovett, D. and Matrisian, L. (1994) Structure and expression of the human gene for the matrix metalloproteinase matrilysin. *J. Biol. Chem.* 269, 2032-2040.
24. Frisch, S. and Ruley, H. (1987) Transcription from the stromelysin promoter is induced by interleukin-1 and repressed by dexamethasone. *J. Biol. Chem.* 262, 16300-16304.

25. Jonat, C., Rahmsdorf, H., Park, K.-K., Cato, A., Gebel, S., Ponta, H. and Herrlich, P. (1990) Anti-tumor promotion and anti-inflammation: Down-modulation of AP-1 (Fos/Jun)activity by glucocorticoid hormone. *Cell*. 62, 1189-1204.
26. Nicholson, R., Mader, S., Nagpal, S., Leid, M., Rochette-Egly, C. and Chambon, P. (1990) Negative regulation of the rat stromelysin gene promoter by retinoic acid is mediated by an AP-1 binding site. *EMBO*. 9, 4443-4454.
27. Jeffrey, J. J., Coffey, R. J. and Eisen, A. Z. (1971) *Biochem. Biophys. Acta* 252, 143-149.