

R  
008-8  
7518

中山醫學院生物化學研究所

碩士論文

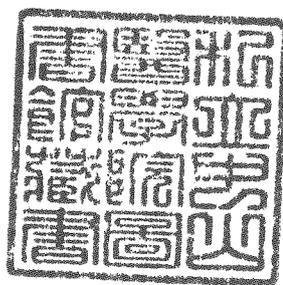
指導教授：謝 易 修 博士

第一部份：大葉合歡種子胰蛋白酶抑制劑  
之純化及性質研究

Purification and characterization of trypsin inhibitor  
from seeds of *Albizia lebbek*

第二部份：S-180 癌細胞中蛋白酶分析

Analysis the protease in Sacoma -180 cells



研究生：陳 玉 美 撰

中 華 民

中山醫學院圖書館



C036193

七 月

# 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 84 學年度第 2 學期所撰 碩士學位論文。

論文名稱：大葉合歡種子胰蛋白酵素之純化及性質研究 S-180 癌細胞胰蛋白酵素分析

同意  不同意  
本人具有著作財產權之論文摘要，授予國家圖書館、本人畢業學校及行政院  
國家科學委員會、本國學術網路、本國學術網路、本國學術網路、本國學術網路  
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、本國學術網路、  
本國學術網路、本國學術網路、本國學術網路、本國學術網路、本國學術網路、本國學術網路  
縮小之服務。年 月 日 後  
再行發表。

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、本人畢業學校、本人畢業學校、本人畢業學校、本人畢業學校、本人畢業學校、  
他人以各種方法重製、發行及學術研究利用均為無償。

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：陳玉美 學號：R8202112  
(親筆正楷)

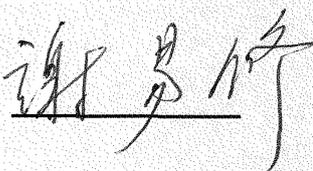
日期：民國 85 年 7 月 31 日

- 備註：1. 上述同意與不同意之欄立若未鉤選，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。



學生陳玉美論文題目為一、大葉合歡種子胰蛋白酶抑制劑之純化及性質研究，二、S-180癌細胞中蛋白酶分析，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：

中華民國85年7月

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論文考試委員審查合格及口試通過。

口試委員

中台醫專食品衛生科副教授

朱淑珍 博士

朱淑珍

中山醫學院生物化學研究所副教授

劉哲育 博士

劉哲育

中山醫學院生物化學研究所副教授  
(論文指導教授)

謝易修 博士

謝易修

中華民國八十五年七月一日

## 誌 謝

衷心感謝我的指導教授謝易修博士帶領我探索生化之奧秘。指導一個離開學校十四年，對實驗完全沒有概念的研究生，由無到有，其間的辛勞付出是無以比擬。我將永遠銘記於心。

謝謝中山醫學院附設醫院藥事副院長周明勇醫師的鼓勵與支持，我才有機會帶職進修碩士學位。進修期間，感謝藥劑科的同仁在工作上多方面的配合。尤其是賴靜珍小姐對我工作的幫助更是非常。

謝謝劉哲育老師和朱淑珍老師對本論文的指導。至凱、耀騰學弟互相鼓勵及實驗上的協助，亦是我必須致謝的。

感謝我的父母、我的夫婿及我深愛的二個女兒幸怡、幸如，沒有他們對我的愛、支持與諒解，沒有今日的成果。

三年的研究生涯，受助於人之多，實難以計數。謹向所有幫助過我的人，表示由衷謝忱。

# 目 錄

第一部份：大葉合歡種子胰蛋白酶抑制劑之純化及性質研究 · · 1

中文摘要	2
英文摘要	3
緒言	4
縮寫	7
材料	8
方法	10
結果	19
討論	23
圖表	25
參考文獻	41

第二部份：S-180 癌細胞中蛋白酶分析 · · · · · 49

中文摘要	50
英文摘要	51
緒言	52
縮寫	59
材料	60
方法	61
結果	64
討論	66
圖表	68
參考文獻	75

第一部份：大葉合歡種子胰蛋白酶抑制劑  
之純化及性質研究

Purification and characterization of trypsin inhibitor  
from seeds of *Albizia lebbek*

## 中文摘要

蛋白酶抑制劑普遍存在於動植物界，在動物體內蛋白酶抑制劑與蛋白酶是以一種平衡的狀態存在，共同維持體內正常的運作。由流行病學之調查指出：經常食用豆科植物之地區，罹患癌症之比例確實較低，而豆科植物富含蛋白酶抑制劑是吾人所知。又許多研究報告，癌細胞之產生、侵襲、轉移與蛋白酶有很大關係。當外加蛋白酶抑制劑或誘生內生性之蛋白酶抑制劑可以改善這些現象。故尋找及利用蛋白酶抑制劑是極具研究意義。

在本研究中，我們由大葉合歡 (*Albizzia lebbek*) 的種子純化出一個胰蛋白酶抑制劑 (ALTI)，並做了一般性質之探討。純化的過程是利用硫酸銨的分割，膠層過濾，離子交換，和親和性管柱層析等方法。由 SDS-PAGE 的分析，我們計算 ALTI 的分子量大約為  $21,000 \pm 1,000$  daltons，並且含有兩個次單元體。由其所含之 cysteine 量，可知 ALTI 是一 Kunitz 型的蛋白酶抑制劑。初步的胺基酸序列分析指出 ALTI 與 ACTI (*Acacia confusa*) 有很高的相似性。

## 英 文 摘 要

A trypsin inhibitor was isolated from the seeds of *Albizzia lebbek*, and it was designated as *Albizzia lebbek* trypsin inhibitor (ALTI).

ALTI was isolated by extracting the seeds of *Albizzia lebbek* with 0.1N HCl, followed by ammonium sulfate fractionation, gel filtration with Sephadex G-50 column, DE-52 column chromatography and affinity chromatography with a trypsin-Sepharose 4B column. The yield of ALTI is 161 mg from 100 gm of seeds. The molecular weight of ALTI is  $21,000 \pm 1,000$ , and it contains 175 amino acid residues without tryptophan. After reduced with  $\beta$ -mercaptoethanol, two peptide chains were obtained by SDS-PAGE. The larger subunit was designated as A chain and the smaller one as B chain.

ALTI has strong inhibitory effect on trypsin and a moderate inhibitory effect on chymotrypsin. It is relatively stable to heat. After modification with either phenylglyoxal or o-methylisourea, the activity of ALTI inhibiting trypsin was eliminated. Therefore, ALTI is a lysyl and arginyl type trypsin inhibitor.

## 緒 言

蛋白酵素抑制劑 (protease inhibitors) 普遍存在於植物界 (1, 2, 3)，如豆科、禾本科及茄科，尤其是豆科。如今，絕大多數豆科植物之種子內含有蛋白酵素抑制劑，已是公認的事實。除植物外，在動物界，如血液 (4)、胰臟 (5)，及微生物界，如酵母菌 (6)，放射菌屬 (7)，鏈黴菌屬 (8) 中，亦發現有蛋白酵素抑制劑的存在。

1938年，Read 和 Hass 發現大豆抽取液中，含有抑制蛋白酵素消化動物膠 (gelatin) 的成分，為最早證實植物中含有蛋白酵素抑制劑 (9)。1944年 Hass 等人將該成分部分純化，並證實其為一種蛋白質 (10)。至 1945年，Kunitz 首先自大豆中分離出胰蛋白酵素抑制劑並析出結晶，是為近代研究蛋白酵素抑制劑之里程碑。

早期研究蛋白酵素抑制劑主要是由營養學之觀點著眼 (13, 14, 15, 16, 17)，因為許多作為食物的植物，如大豆、大麥、馬鈴薯、蠶豆等，都含有胰蛋白酵素抑制劑，若以未煮熟之大豆餵食雞或老鼠，可觀察到其生長受抑制，胰臟腫大 (18, 19, 20)，於是 Liener 等人提出假說來說明蛋白酵素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，去除蛋白酵素抑制劑的作用，以提高植物性食物的營養價值。在食品工業界已成功的達到此一目的。

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

自然界存在的蛋白酵素可依其活性位置及作用方式分為：絲胺酸型蛋白酵素 (如胰蛋白酵素，凝乳酵素)，硫醇型蛋白酵素 (如木瓜酵素) 金屬型蛋白酵素 (如 carboxypeptidase A, B) 及酸性蛋白酵素 (如胃蛋白酵素)。自然界中，此四種蛋白酵素的抑制劑均存在，然其專一性各不相同，有些只能抑制一種或二種蛋白酵素，有些則可抑制兩種以上的蛋白酵素。而這些能抑制兩種或兩種以上的蛋白酵素抑制劑又可分為兩種，一稱為雙頭型，如賴馬豆，可同時抑制胰蛋白酵素和

凝乳酵素，但二者之活性位置不同。另一為單頭型，即抑制數種蛋白酵素之功能皆由同一活性位置負責，如馬鈴薯所存有之抑制劑。

胰蛋白酵素抑制劑又可依其活性有關之胺基酸，分為離胺酸型與精胺酸型二類 (26)，然不屬於此二類者亦陸續被發現，如自人類精液中分離出一種胰蛋白酵素抑制劑 (27)。

小分子蛋白酵素抑制劑由於分子量不大，有許多一級結構已被定出，由這些胺基酸的排列，可相比較找出共同的序列，使植物的分類與演化能做深入的比較。如 Richardson (31) 曾比較四種豆科植物的蛋白酵素抑制劑，發現其胺基酸的排列非常類似。而 Ryan (32) 等人，則發現馬鈴薯內兩種不同型的蛋白酶抑制劑，即凝乳酵素抑制劑（屬絲氨酸型蛋白酵素抑制劑），與 carboxypeptidase 抑制劑（屬金屬型蛋白酵素抑制劑）此二者有許多類似的胺基酸，顯示由同一基因演化而來。

此外，Tan 與 Stevens (33, 34)，發現賴馬豆抑制劑的一級結構內有序列重複的現象，與從大豆內發現之 Bowman-Birk (35) 抑制劑及 Garden bean (15) 抑制劑都有類似情形，這可能是由於基因複製的結果 (31)。又抑制劑的活性位置往往位於此重複序列內，故雙頭型乃至於多頭型抑制劑極可能因此而產生。

蛋白酵素抑制劑在植物的生理意義為何，直到目前，仍不清楚，一般我們相信，脊椎動物胰臟存在的胰蛋白酵素抑制劑可阻止蛋白酵素原及胰臟其他酵素的過早活化，而哺乳類動物血液中，蛋白酵素抑制劑可參與凝血作用 (57)，纖維蛋白分解，補體之活化以及發炎反應 (42)。植物內蛋白酵素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，且在各種組織器官內，抑制劑的分佈量亦隨生理發展而改變 (73)，如於種子內含量多，但發芽時，則會漸漸減少，目前只能推測蛋白酵素抑制劑的存在，或許是一種蛋白的貯存方式，或許保護植物本身以對抗昆蟲與微生物的侵襲 (74)，亦有可能具有調節植物本身酵素活性與代謝的功能。

近年來醫藥界方面，期望這些蛋白酵素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 (1)。目前市面上發售的 Foy，即利用胰蛋白酵素抑制劑做成的藥劑。此外，蛋白酵素在癌細胞產生的

發展上，除了與細胞侵襲及轉移有關外 (36, 37)，蛋白酵素還可使細胞失去接觸性生長抑制的性質，而使癌細胞毫無限制的生長 (38, 39)，甚至發生重疊現象，並且由於蛋白酵素在細胞表面作用，使得細胞膜的性質也發生變化，不但形狀異常，細胞膜上接受器的移動能力也增加，使得親糖蛋白對其之凝集活性增加，而這些性質在給予蛋白酵素抑制劑後均會改善，故如何利用蛋白酵素抑制劑來抑制腫瘤細胞之生長，乃是一項極具意義的研究 (40, 41)。

本文中所用實驗材料大葉合歡 (*Albizzia lebbek*)，屬於豆科，初步試驗得知，其亦如同大多數之豆科植物含有胰蛋白酵素抑制劑，故進一步純化分析，以期能發揮運用於醫療，對人類有所裨益。

## 縮 寫

ALTI : *Albizzia lebbek* trypsin inhibitor

BAPNA :  $\alpha$ -N-Benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilide hydrochloride

BSA : Bovine serum albumin

CAPS : 3-[Cyclohexylamino]-1-propanesulfonic acid

DMSO : Dimethyl sulfoxide

MSH : 2-Mercaptoethanol

PVDF : polyvinylidene fluoride

SDS : Sodium dodecyl sulfate

TCA : Trichloroacetic acid

TEMED : N,N,N',N'-Tetramethylene diamine

TPCK : Tosyl-phenylalanyl chloromethyl ketone

Tris : Tris(hydroxymethyl)-aminomethane

## 實驗材料

1. 大葉合歡( *Albizzia lebbek* ) 種子，本省出產。

2. Sephadex G-50; Sephadex G-25, Sepharose-4B 購自Pharmacia 公司。

3. DEAE-cellulose( DE - 52) 購自英國 Whatman 公司。

4. 蛋白質水解酶

$\alpha$ -chymotrypsin , trypsin-TPCK , trypsin , thermolysin , protinase K  
nargase 購自美國 Sigma公司。

5. 試藥

BAPNA購自美國 Sigma 公司。

Casein

Coomassie brilliant blue R-250 購自美國 Serva 公司。

Iodoacetic acid 購自美國 Sigma 公司。

2-Mercaptoethabnol 購自美國 Sigma 公司。

Folin reagent 購自和光純藥株式會社公司。

SDS 購自美國 Serva公司。

BSA 購自美國 Sigma公司。

phenylglyoxal 購自東京化成株式會社公司。

o-methylisourea 購自東京化成株式會社公司。

6. 儀器

Atto AE-6675 Horizblot

Beckman J2-MC centrifuge

Beckman DU640 spectrophotometer

Beckman ODS-DABS HPLC column(4.6 mm X 25 cm)

Consort microcomputer electrophoresis

Eyela micro tube pump MP-3

Hitachi L-6200A intelligent pump

Hitachi L-4250 UV-VIS detector

Hitachi LC organizer

Hitachi D-2500 chromato-integrator

Hitachi L-5200 fraction collector

## 實驗方法

### 1. 親和性色層分析管柱 (affinity chromatography column) 之製備 (49)

#### (1) 以溴化氰活化 Sepharose-4B

將 Sepharose-4B 凝膠置於瓷漏斗上，以蒸溜水洗去酒精及殺菌劑。稱取 40 克，浸泡於 200 毫升蒸溜水中，隨後加入 1.6 克溴化氰，在 pH meter 上以 5N 氫氧化鈉滴定，使反應溶液維持在 pH 11.0，保持溫度在攝氏 5 到 10 度間，經常攪拌且需密閉，以防溴化氰之逸出。反應約 20 分鐘後，立即置於瓷漏斗上，以冷的 0.1N 碳酸氫鈉溶液沖洗。

#### (2) 胰蛋白酶素的連結 (coupling)

將上述活化的 Sepharose-4B 凝膠以蒸溜水沖洗後，再以連結緩衝液 (coupling buffer: 0.025 M borate buffer, pH 10.2 內含 0.02 N NaCl) 沖洗，取出凝膠置於 100 毫升的連結緩衝液內，並加入 400 毫克的胰蛋白酶，充入氮氣，密封，置於攝氏 4 度以下，溫和攪拌 12 小時，即可完成。

#### (3) 沖洗步驟

將上述作用後的凝膠，倒入玻璃管柱中，並用連結緩衝液沖洗，直到未連結在凝膠上之胰蛋白酶素被洗出，如此可計算胰蛋白酶素連結效率。再於室溫中以下述緩衝液各 1 升沖洗。

### 2. ALTI 的分離純化

稱取 100 克大葉合歡種子，洗淨，浸泡於 600 毫升 0.1 N HCl 中，攝氏 4 度下靜置過夜。隔天於攝氏 4 度下進行下列步驟：用果汁機 (Waring blender) 打成漿狀，靜置 2-3 小時，以萃取 ALTI。先以紗布濾除纖維殘渣，再用 Beckman J2-MC 冷凍離心機，於攝氏 4 度以 12,000 rpm 離心 15 分鐘，取上清液，慢慢加入固體硫酸銨至 50% 飽和濃度，待沈澱生成達穩定後，再以 12,000 rpm 離心 20 分鐘，除去沈澱，上清液續加入固體硫酸銨至 90% 飽和濃度，再以 12,000 rpm 離心 20 分鐘，所得沈澱，移置於透析袋，於攝氏 4 度下，對 0.01 M acetic acid 透析 48 小時，並換 4 次透析液，之後，透析袋內之物以 12000 rpm 離心 20 分鐘，除去不溶之雜質，上清液通過事先以 0.01 M 醋酸平衡過的 Sephadex-G50 管柱 (1.5 x 90 cm) 以 0.01 M 醋酸為沖洗液其流速為每 2 分鐘 1 毫升，以 Hitachi L- 5200 collector 收集流出液，每 9 分鐘收集一管，每管 4.5 毫升，測其波長 280 nm 的吸收，可得兩個蛋白吸收峰，經活性測定後，知第二個蛋白吸收峰具有胰蛋白酶之抑制作用。收集此具活性之吸收峰蛋白溶液，加入固體硫酸銨至 90% 飽和濃度，以 12,000 rpm 離心，將沈澱物移入透析袋中，對 0.01 M, pH 8.0, 的磷酸鹽緩衝溶液透析 36 小時，再以 12,000 rpm 離心，除去不溶物後，通入事先以 0.01 M, pH 8.0, 的磷酸鹽緩衝溶液平衡過之 DE-52 管柱 (1.6 X 15 cm)，以 0.01 M, pH 8.0 的磷酸鹽緩衝液為沖洗液，將無法附於管柱上之蛋白洗去，此階段可得一蛋白吸收峰，當在 280 nm 下檢測不出蛋白吸收值時，再以 0 - 0.3 N 鹽直線階梯沖洗，可得到一具有活性之蛋白吸收峰。收集此吸收峰之蛋白溶液，直接通入以 0.01 M, pH 8.0, 的磷酸鹽緩衝溶液平衡好之胰蛋白酶連結 Sepharose-4B 管柱 (2.6 X 30 cm)，以含 0.05 M lactose 之 0.01 M, pH 8.0, 的磷酸鹽緩衝溶液為沖洗液，續以 0.01 M, pH 8.0, 的磷酸鹽緩衝溶液沖洗，可將非特異性結合之蛋白質去除，最後以含 0.01 N 鹽酸溶液沖提，可得一蛋白峰，此即所欲純化之 ALTI。

### 3. SDS-聚丙烯酰胺板膠電泳法 (54)

(SDS-polyacrylamide slab gel electrophoresis)

(1) SDS-聚丙烯酰胺板膠之製備：

(a) 板膠製備之裝置：

主為二塊平面玻璃 (15 X 19 cm)，而其中一塊上方呈凹狀，在二片玻璃中，以三片塑膠片 spacer (0.15 X 1.2 X 15 cm)，置於玻璃間的左、右邊及下方，在底部二片膠片接合的地方，塗上凡士林，使結合緊密，然後用夾子夾住玻璃的左、右邊及下面，而其中的空間便可容納凝膠，作成板膠。

(b) 配製 15% 聚丙烯酰胺的 separating gel：

取含有 30% 丙烯酰胺 (acrylamide)，0.8% N, N'-methylene-bis-acrylamide 的丙烯酰胺溶液 10 毫升，加入 pH 8.8, 1.5 M Tris-HCl 緩衝液 5 毫升，10% SDS 0.2 毫升，混合均勻，以減壓幫浦抽去其中的氣泡，再加入新鮮配製的過硫酸銨溶液 (10 毫克/毫升) 1 毫升，TEMED 6.7 微升，最後加入蒸溜水至總體積為 20 毫升。將上述配製的凝膠溶液，小心注入以備好之玻璃板裝置中，至 9 公分處，於凝膠上方小心覆蓋一層蒸溜水，使凝膠液面保持水平，於室溫下約須 1 小時便可凝聚完成，待凝膠面形成後，倒掉上面的水層，續做 stacking gel。

(c) 配製 3% 聚丙烯酰胺的 Stacking gel：

取含有 30% 聚丙烯酰胺 (Acrylamide)，0.8% N, N'-methylene-bis-acrylamide 的丙烯酰胺溶液 1 毫升，加入 pH 6.8, 0.5 M Tris-HCl 緩衝液 2.5 毫升，10% SDS 0.1 毫升，混合均勻，再加入新鮮配製的過硫酸銨溶液 (10 毫克/毫升) 0.5 毫升，TEMED 25 微升，最後加入蒸溜水至總體積為 10 毫升。將上述配製的凝膠溶液，小心注於已凝聚完成之 separating gel 上方，且放一個梳狀的固定模型於凝膠上，待凝聚後，便可形成 U 字

形的槽 (Well)，可以容納樣品。

## (2) Tray buffer 的製備：

3 克 Tris，14.7克甘胺酸，加入 10 毫升的 10% SDS，然後加蒸溜水至 1 升，配成 0.025 M，pH 8.3，內含 0.1% SDS 的 Tris-甘胺酸緩衝液。

## (3) 樣品的製備

取濃度 1 毫克/毫升的 ALTI 溶液 100 微升，加入 10 微升的 10% SDS，5 微升  $\beta$ -MSH (加或不加)，2 微升 1.5M，pH 8.8 Tris-HCl，於攝氏 100 度下加熱 2 分鐘，再加入一滴甘油及 3 微升的指示劑 (0.05% bromophenol blue) 後備用。

## (4) 電泳的操作

將下方電泳槽內注滿 tray buffer，將已做好之板膠下方之塑膠片及梳狀固定模型除去，並將此玻璃板膠架於電泳槽上，而有凹狀的玻璃朝向電泳槽，之後，將上方電泳槽內注滿 tray buffer，使 U 型槽亦浸於 tray buffer 內。取約 25 微升的 ALTI 樣品溶液，置於 U 型槽內，電泳槽上方連接負極，下方連接正極，先以 20 毫安培的電流通電，待指示劑移行至 separating gel 與 stacking gel 交接面時，再將電流加至 40 毫安培，當指示劑移行至距板交底部 0.5 公分時，停止通電，將 gel 自二塊玻璃片中取出，割去 stacking gel，將 separating gel 部份置於盤中，進行染色及退色。

## (5) 染色及退色

### (a) 染色液之配製：

取 1.25 克 coomassie brilliant blue R-250，溶於 227 毫升甲醇，加入 46 毫升醋酸及適量蒸溜水至總體積 500 毫升，混合均勻，過濾備用。

(b) 退色液之配製：

取 75 毫升醋酸，50 毫升甲醇，加蒸溜水至總體積 1000 毫升，混合均勻而成。

(c) 電泳後的板膠，浸於染色液中 1 至 2 小時，倒出染色液，換以退色液，可加熱至攝氏 40 度，或將吸水紙揉置於退色盤內，以促進退色速度，退色液更換數次後，可見凝膠上蛋白質所在處呈現藍色，染色前後均測量當時板膠全長及蛋白移動距離，以作為估計蛋白質分子量之用。

(6) 移行率 (mobility) 的計算

$$\text{移行率} = \frac{\text{蛋白移動距離}}{\text{退色後板膠長度}} \times \frac{\text{染色前板膠長度}}{\text{指示劑移動距離}}$$

(7) 分子量的測定

取已知分子量的蛋白質，做同樣的電泳分析，計算移行率，使用半對數表，以分子量對移行率劃出標準曲線，可由內插法計算出分子量。

(8) 板膠之保存

經 SDS-PAGE 分析後之板膠，照相後可將其乾燥保存之。

方法一：備玻璃板一塊，將兩張較玻璃板略大的玻璃紙以水潤溼，取其中之一平鋪於玻璃板上，把欲乾燥之板膠放在上面，使其間無空氣存在，再小心將另一張玻璃紙鋪在膠上面，同樣的讓紙與紙和紙與膠間不存有氣泡，用夾子均勻的將其固定，室溫下自然乾燥。

方法二：取適當大小之濾紙以水濕潤，將欲乾之膠置於其上，上鋪以濕潤的玻璃紙，使其間沒有氣泡存在，置於乾燥機乾燥之。

#### 4. 胺基酸水解分析 (56)

##### (1) 酸水解

取 20 ul 的 ALTI (25-100 ug/ml) 置於水解管，於真空抽氣箱內乾燥，將水解管置於水解瓶內之架上，放入 1 mg 之固態酚，加入 0.7 毫升 6N 鹽酸於瓶內，以真空幫浦抽氣至稍微冒泡，將瓶蓋拴緊，置於攝氏 110-115 度下 24 小時。取出，以真空幫浦抽乾，去除鹽酸。以 Beckman 之 dabsylation kit 將水解後之胺基酸 dabsylation，再通入 Beckman ODS-DABS HPLC column 做胺基酸組成分析。

##### (2) 酥胺酸 (threonine) 與絲胺酸 (serine) 的分析

ALTI 分別做 24, 48, 72 小時不同的酸水解，水解液以胺基酸自動分析儀分析。計算出酥胺酸與絲胺酸的量，分別對時間作圖，由外插法求 0 時之量，即是二胺基酸的真正含量。

##### (3) 半胱胺酸的定量 (58)

利用 performic acid oxidation 的方法。

performic acid solution 的製備：

將一倍體積的 30% 過氧化氫與 9 倍體積的 98% formic acid，1 小時後，於冰浴中冷卻，加入 1 倍體積的甲醇與 0.1 倍體積的 80% phenol，而形成過甲酸溶液。將 1 毫克的 ALTI 置於水解管中，加入 0.2 毫升上述的 performic acid solution，於攝氏 0 度下作用 2 個小時，performic acid 可將半胱氨酸完全氧化成 cystic acid，之後利用真空抽氣，除去 performic acid，續作酸水解，以胺基酸自動分析儀進行分析。

#### 5. 還原與梭甲基化作用 (reduction and S-carboxymethylation) (21, 60)

取 50 毫克 ALTI 溶於 7 毫升的 Tris-Urea-EDTA 緩衝液中 (含有 8 M urea, 0.2% EDTA 的 1.0 M Tris-HCl, pH 8.6)，加入 100 微升  $\beta$ -MSH，於攝氏 37 度下反應 16 小時，另將 270 毫克的碘醋酸溶於 1 毫升的 1 N NaOH 溶液中，並將 pH 值調為 8.0 左右，避光加入上述還原的蛋白溶液中 (避光加入以防止酪氨酸的碘化作用)，於攝氏 37 度進行梭甲基化作用，一小時後，立刻通入先以 0.1 M 碳酸氫銨，pH 8.0 平衡過的 Sephadex G-50 管柱 (1.5 x 90 cm)，流速每小時 30 毫升，每管 4 毫升，測其在 220 nm 與 280 nm 的紫外光吸收值，收集吸收峰的蛋白，冷凍乾燥後，即得梭甲基化的 ALTI。

#### 6. 以高效能液相色層分析法 (HPLC) 分析 ALTI

將 ALTI 之溶液打入事先以 TFA (0.05%) 平衡過的 C-18 reversed phase column (0.5 x 25 cm)，以 0-60% acetonitrile (內含 0.05% TFA) 做 linear gradient 沖流，流速為 1 ml/min，以波長 220 nm 測定。

## 7. ALTI的化學修飾

### (1) 以 O-methylisourea 修飾離胺酸 (65, 66)

取 250 毫克的 O-methylisourea sulfate 溶於 0.5 毫升蒸溜水後，置於冰浴中，慢慢加入熱的氫氧化鋇飽和溶液，直到懸浮液的 pH 值呈中性為止，加蒸溜水至 5 毫升，離心，除去沈澱，取上清液 4 毫升，加入 10 毫克 ALTI，以少許氫氧化鈉將 pH 值調至 10.5，反應溫度維持在攝氏 4 度，反應時間為 10 分鐘至 2 天不等，達預定時間則取出 0.5 毫升反應溶液，加 0.5 毫升的醋酸鈉緩液，使 pH 值降至 7 以下，以終止反應。然後迅速通過以 0.1 N 醋酸平衡過的 Sephadex G-25 管柱 (1 x 45 cm)，以除去過剩的 O-methylisourea。反應後的蛋白溶液一部份做酸水解分析胺基酸組成，另一部份用來測定胰蛋白酶抑制活性分析。經修飾過的蛋白質，其氨基酸中的離胺酸轉變成類精胺酸 (homoarginine)，在胺基酸組成分析中，出現於精胺酸之後。同時作對照組，將 ALTI 於相同條件下處理相同時間，只是不加 O-methylisourea，以排除鹼性對 ALTI 的影響。

### (2) 以 phenylglyoxal 修飾精胺酸 (67, 68)

將 10 毫克 ALTI 溶於 9 毫升的 0.1 M, pH 8.0 碳酸氫鈉溶液中加入 1 毫升的 phenylglyoxal (含 20 毫克的 phenylglyoxal)，於室溫下避光反應 5 至 120 分鐘不等，達預定時間，即取出 1 毫升反應溶液，加入同體積的 60% 醋酸溶液，使成 30% 醋酸溶液，此可使反應終止，且使被修飾的精胺酸穩定。然後通過已經用 0.1 M 醋酸溶液平衡過的 Sephadex G-25 管柱 (1 x 45 cm)，除去過剩的 phenylglyoxal。反應後的蛋白，一部份做酸水解，分析精胺酸殘留量，一部份則做抑制活性分析。同樣，亦做不加 phenylglyoxal 的對照組。

## 8. 溫度對 ALTI 活性的影響 (62)

將 ALTI 溶於 0.1 M, pH 8.0 磷酸鹽緩衝液，於不同溫度(攝氏 40 度 100 度)水浴中處理 30 分鐘，立即冷卻至室溫，再做胰蛋白酶抑制劑活性分析，計算殘餘的抑制活性。

## 9. 蛋白的轉印 (transferring protein to PVDF membrane) (72)

將 ALTI 做 SDS-PAGE 分析，經電泳後的膠片以 blotting buffer (CAPS buffer: 10mM CAPS, pH 11.0, in 10% methanol) 潤溼約 5 - 10 分鐘；另外 PVDF 膜和 3 mM 濾紙事先以下列步驟處理備用：(1) 以 100% 甲醇潤溼 (2) 以 dH<sub>2</sub>O 洗 (3) 浸於 blotting buffer 中。將 3-4 層濾紙、PVDF 膜、膠片、3-4 層濾紙依序由下而上排列於上，以 2.0 毫安培每平方公分之電流吸漬 60 分鐘。Blotted 後之 PVDF 膜先以蒸溜水潤溼，以染色液 (0.05% coomasie blue R 250 in 50% methanol) 染約 5- 10 分鐘，再以退色液 (50% methanol) 退色 5-10 分鐘。即可剪下所要之處，做胺基酸定序用。

# 結 果

## 1. ALTI的純化(圖一)

本實驗 ALTI 的純化，是先以 pH 4.0, 0.01N 醋酸溶液萃取，所得萃取液以 50% 和 90% 飽和硫酸銨進行分割，初步除去一些小分子雜質及不具抑制活性的蛋白。95% 飽和濃度硫酸銨所沈澱的蛋白對 pH 4.0, 0.01 N 醋酸溶液透析，通入 Sephadex G-50 管柱做膠層過濾，以 280 nm 光譜測定，可得二吸收峰(圖二)，由胰蛋白酶抑制活性測定法測知後一個吸收峰具胰蛋白酶抑制活性。將含有胰蛋白酶抑制活性的分液 (fraction)，混在一起。以 90% 硫酸銨將蛋白沈澱下來，以少量一次溶解，置於透析袋於 pH 8.0, 0.01 M 磷酸鹽溶液透析後，除去不溶性物質，再通入 DE-52 管柱，將無法附著於管柱上之蛋白洗去，此階段可得一蛋白吸收峰，當在 280 nm 下檢測不出蛋白吸收值時，再以 0 - 0.3 N 鹽直線階梯沖洗，可得到二具有活性之蛋白吸收峰(圖三)。收集含大部分活性之吸收峰之蛋白溶液，直接通入以 0.01 M, pH 8.0, 的磷酸鹽緩衝溶液平衡好之胰蛋白酶連結 Sepharose-4B 管柱 ( 2.6 X 30 cm )，以含 0.05 M lactose 之 0.01 M, pH 8.0, 的磷酸鹽緩衝溶液為沖洗液，續以 0.01 M, pH 8.0, 的磷酸鹽緩衝溶液沖洗，可將非特異性結合之蛋白質去除，最後以含 0.01 N 鹽酸溶液沖提，可得一蛋白峰(圖四)，此即所欲純化之 ALTI，將此有活性之分液混合，以冷凍乾燥法乾燥，則可得到白色物質。

## 2. SDS-PAGE 分析(圖五，圖六)

經親和性管柱層析法分離所得的 ALTI，做 15% SDS-PAGE 分析，染色退色後，呈現單一色帶，再經 HPLC 分析，更確定 ALTI 已均質。若予已知分子量蛋白之移行率做比較，可約略估算 ALTI 的分子量大約為  $21000 \pm 1000$ 。但若於電泳前，先將 ALTI 以  $\beta$ -MSH 處理，染色退色後，出現兩個色帶，其移行率皆較 ALTI 為快，其分子量大約為  $14,000 \pm 1,000$  和  $5,000 \pm 1,000$ ，這表示

ALTI 經  $\beta$ -MSH 處理後，因雙硫鍵還原，而分開成兩個次單元體，分子量大的稱 A 次單元體，分子量較小的稱 B 次單元體。

### 3. 胺基酸的組成分析(表二)

ALTI 經自動分析儀分析，不包括 tryptophan，約含 175 個胺基酸，分子量計算值約 21,000 daltons，與板膠電泳法估計值相符。ALTI 可受切割而形成 2 個次單元體，A 次單元體和 B 次單元體，由還原與梭甲基化分離此兩個次單元體，經酸水解的結果，顯示一含有 3 個半胱胺酸，另一含有 1 個半胱胺酸。A 次單元體具有 135 個胺基酸，分子量約 16,250 Da，B 次單元體含 40 個胺基酸，分子量約為 4,800 Da。其中 B 次單元體不含 tyrosine 且 phenylalanine 之量較 A 次單元體為少，故 280 nm 之吸光值較 A 次單元體低。

### 4. 還原與梭甲基化作用(圖七)

ALTI 經還原與梭甲基化作用後，通 Sephadex G-50 後，可得 220 nm 2 個蛋白峰。

### 5. 以 HPLC 分析還原與梭甲基化作用後之產物(圖八)

經由 HPLC 分析更確定梭甲基化作用，可將 ALTI 分成 2 個次單元體。第一個吸收峰是 B 次單元體，第二個吸收峰是 A 次單元體。

### 6. ALTI 之專一性抑制作用的測定

ALTI 除對 trypsin 具高度抑制活性外，對  $\alpha$ -chymotrypsin 亦略具抑制活性，但對其他所試驗的各種酵素，包括 proteinase K, nargase, thermolysin 則完全不具抑制活性。

## 7. 離胺酸的化學修飾(圖九)

利用 O-methylisourea 對 ALTI 的離胺酸做修飾，使 guanidination 成類精胺酸，經反應 10 分鐘後，已喪失對胰蛋白酶酶的抑制活性。

## 8. 精胺酸的化學修飾

利用 phenylglyoxal 對 ALTI 的精胺酸做修飾，經反應 30 分鐘後，已喪失對胰蛋白酶酶的抑制活性。

## 9. ALTI 抑制 trypsin 的濃度效應

顯示不同量之 ALTI 對定量胰蛋白酶酶的抑制情形。當 ALTI 量增加時，胰蛋白酶酶之活性漸被抑制，由外插法可求得胰蛋白酶酶完全被抑制時，所需之 ALTI 之量。由此知 ALTI 與胰蛋白酶酶的莫耳數比為 1:1。

## 10. ALTI 抑制 $\alpha$ -chymotrypsin 的濃度效應(圖十一)

ALTI 對  $\alpha$ -chymotrypsin 略具抑制活性，即使 ALTI 量達到 80 ug，仍保有 40%  $\alpha$ -chymotrypsin 的活性。

## 11. 溫度對 ALTI 的影響(圖十二)

ALTI 對熱具有相當的穩定性，在攝氏 60 度加熱 30 分鐘，仍保有其活性，加熱到攝氏 80 度時，明顯降低活性至 10%。

## 12. ALTI 之定序(圖十三)

利用 electroblotting 方法，將經 SDS-PAGE 分析後之 ALTI 轉印到 PVDF 膜，再做胺基酸定序。可以得到 A, B 兩次單元體之 N-端序列。與已知的ACTI比較，具有非常高之相似性。

## 討 論

從植物中分離蛋白酶抑制劑的方法，包括早期的結晶法<sup>(11)</sup>，後來的離子交換法，膠層過濾法，以及親和性色層分析法<sup>(70)</sup>，本實驗則利用沈澱法、離子交換法之後，再以專一性高的親和性色層分析法來達到完全純化 ALTI 的目的。以往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，可大致分為二類<sup>(4)</sup>，其中一種是 Bowman-Birk 型、分子量為 8,000 至 10,000 daltons，半胱胺酸占胺基酸總量 20%，另一種即是 Kunitz 型，分子量約 20,000 daltons，半胱胺酸含量甚低。ALTI 分子量約 21000，約含 4 個半胱胺酸，故將其列於 Kunitz 型的抑制劑。

本文所純化的 ALTI，於專一性測定結果顯示，所用的五種蛋白酶： $\alpha$ -凝乳酶，nargase，proteinase K，thermolysin，而 ALTI 只能抑制胰蛋白酶及部份  $\alpha$ -凝乳酶之活性，而完全不抑制 nargase，proteinase-K，thermolysin。

Laskowas 與 KiSealock 曾研究多種蛋白酶抑制劑的活性位置，發現抑制劑的活性位置均位於雙硫鍵所形成的環狀構造內。而雙硫鍵破壞後，活性消失<sup>(71, 72, 73)</sup>，推測雙硫鍵對於抗熱、抗酸鹼之程度、分子結構之穩定性具有決定性的意義。由本實驗所作穩定性試驗中，得知 ALTI 對熱具有相當之穩定性，於攝氏 60 度處理 30 分鐘，仍具有百分之百的活性，而於攝氏 80 度下處理 30 分鐘，仍保有約 10% 的抑制活性。

胰蛋白酶抑制劑與胰蛋白酶間作用方式的反應機轉，向來為學者所重視。近來不少報告顯示，多數抑制劑與胰蛋白酶結合的位置即為酶催化作用的位置<sup>(77, 78)</sup>，而胰蛋白酶水解蛋白質 peptide 鍵之特異位置為離胺酸—X 或精胺酸—X。在 1968 年 Liu 等人將胰蛋白酶抑制劑依抑制作用方式區分為離胺酸型與精胺酸型二大類<sup>(79)</sup>，若化學修飾法將前者之離胺酸或後者之精胺酸修飾，則會喪失其抑制活性。常見之離胺酸型抑制劑包括有大豆的 Bowman-Birk 胰蛋白酶抑制劑<sup>(35)</sup>，賴馬豆胰蛋白酶抑制劑<sup>(80)</sup>與雞豆胰蛋白酶抑制劑<sup>(81)</sup>，

*Acacia elata* 的胰蛋白酶抑制劑。精胺酸型抑制劑則如大豆中的 Kunitz 胰蛋白酶抑制劑及來自 Garden (82)，蓖麻子 (72)，苦瓜 (73) 等分離出的胰蛋白酶抑制劑。

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。譬如利用 2,3-butanedione，glyoxal，phenylglyoxal，cyclohexanedione 等(79, 84, 85)，本文採用 phenylglyoxal 不可逆修飾法，ALTI 的精胺酸，經過 30 分鐘時間修飾後，其抑制活性完全消失，可知精胺酸與 ALTI 的抑制活性有關。

圖 表

Table 1. Summary purification of ALTI from *Albizzia lebbek*

Fraction	Total protein (mg)	Total activity (unit)	Specific activity (unit/mg)	Purification Factor (fold)	Yield (%)
Crude extract	4574	1771	0.38	1.00	100
50-90% A.S. fractionation	1800	1004	0.55	1.45	56
Sephadex-G50 chromatography	954	734	0.77	2.02	41
DE-52 chromatography	439	562	1.28	3.36	31
Trypsin-S-4B chromatography	161	230	1.42	3.70	13

表一：ALTI 分離純化過程的各項回收率。

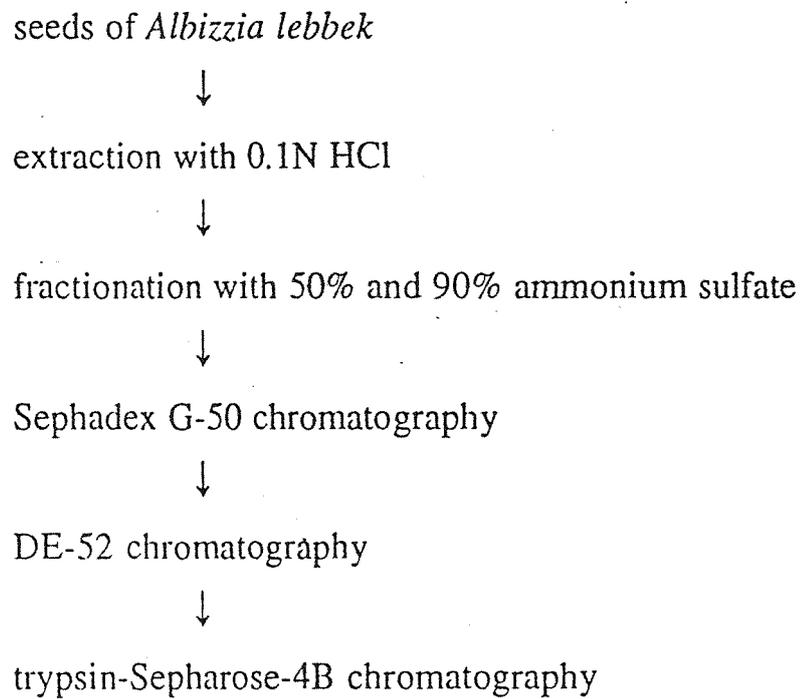
Table 2. Amino acid composition of ALTI and ALTI-A, B subunit

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

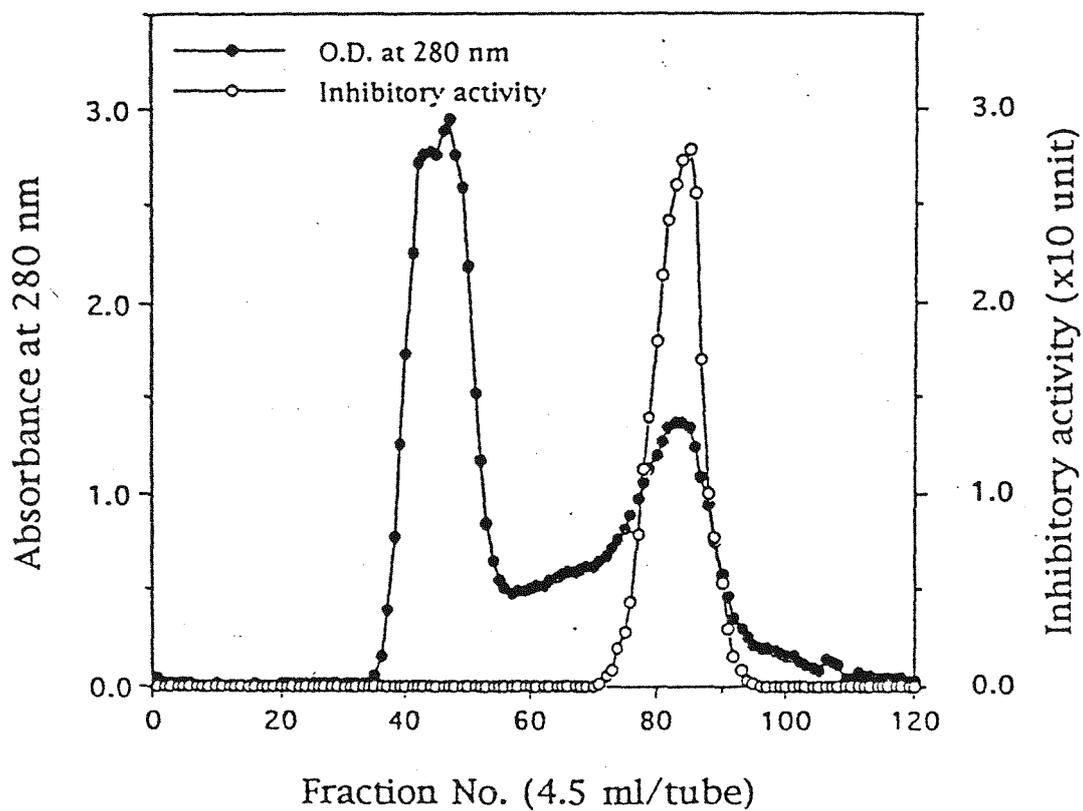
ND : Not detect

M.W. : Molecular weight

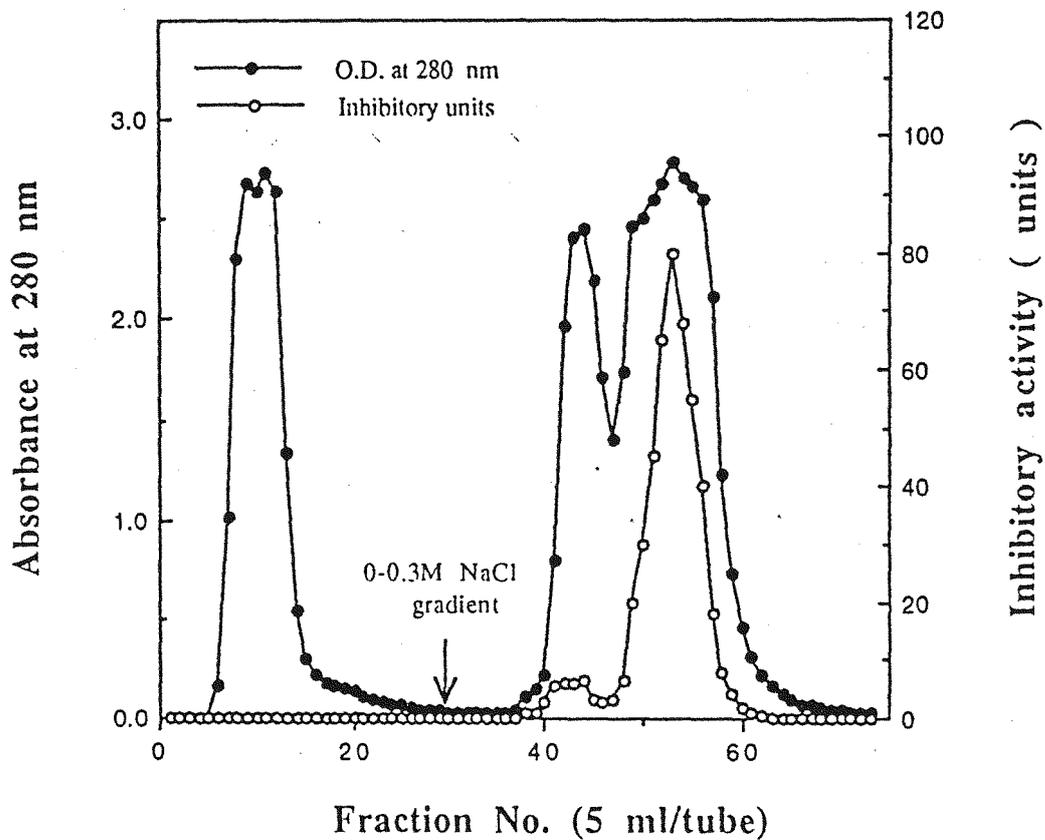
表二：ALTI，ALTI-A次單元體，ALTI-B 次單元體的氨基酸組成。



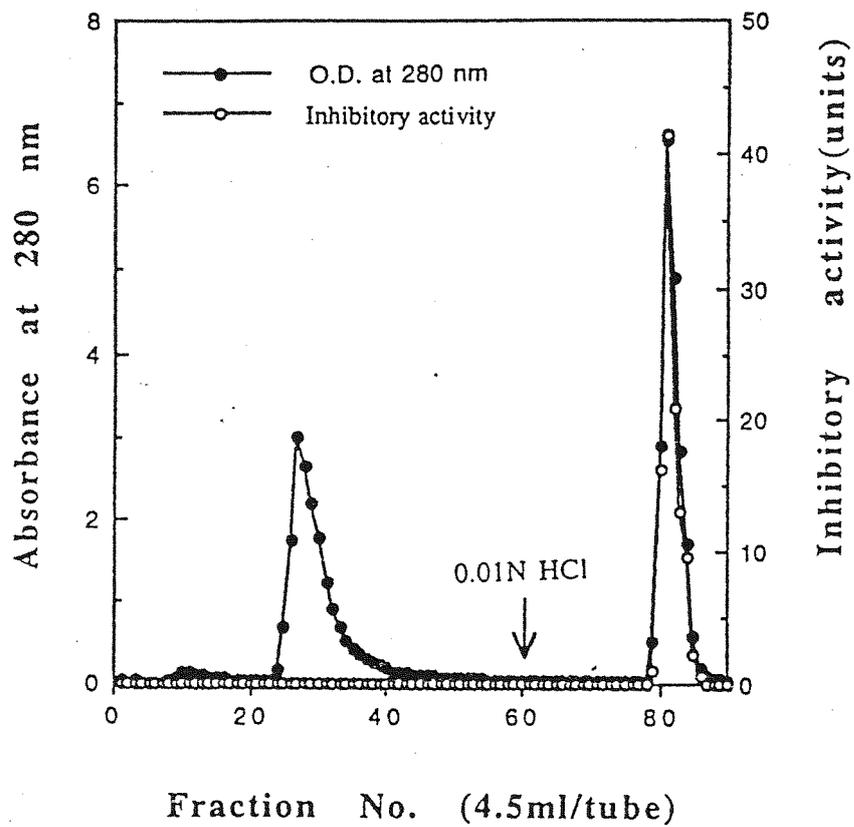
圖一：ALTI 分離純化之步驟。



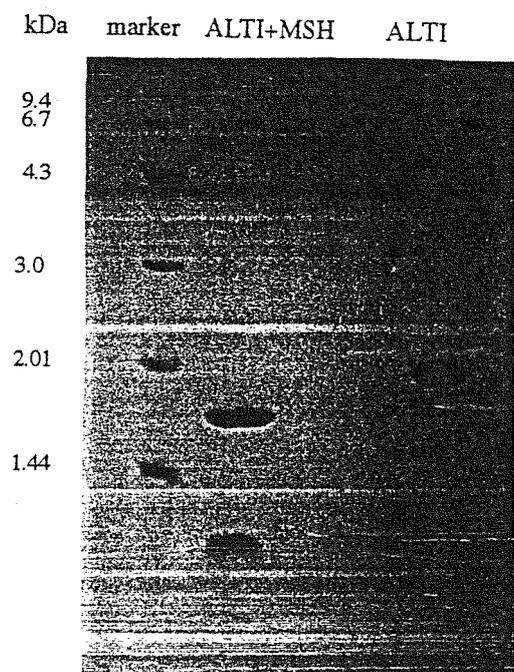
圖二：Sephadex G-50 膠層過濾。將90%硫酸銨打下之蛋白以0.1 N 醋酸透析後之上清液通入Sephadex G-50管柱，以 0.1 N 醋酸為沖流液，於280 nm紫外光測各分液之吸收值，並做抑制活性含量測試。



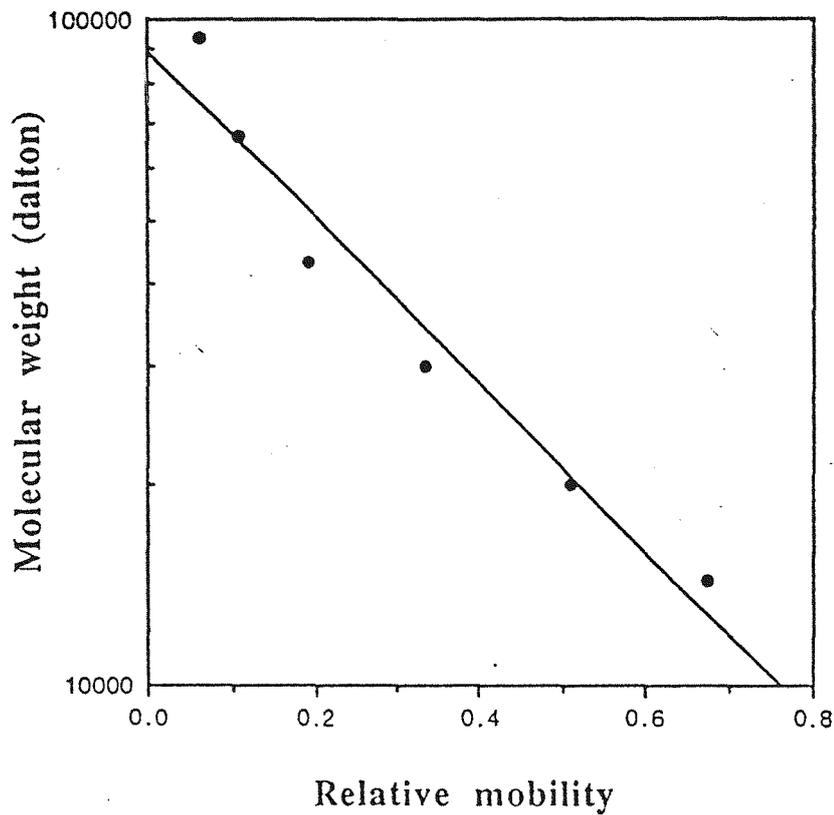
圖三：DE-52 離子交換法。將經0.01 M, pH 8.0 磷酸鹽緩衝液透析後之上清液通入DE-52管柱，以 0.01 M, pH 8.0 磷酸鹽緩衝液當沖流液，再以 0-0.3 N 的鹽直線階梯沖流，於280 nm紫外光測各分液之吸收值，並做抑制活性含量測試。



圖四：Trypsin-Sepharose-4B 親和性管柱法。將經DE-52層析後有抑制活性之液鋪在一起，通入Trypsin-Sepharose-4B 親和性管柱，以 0.01N 鹽酸溶液沖提，於280 nm紫外光測各分液之吸收值，並做抑制活性含量測試。



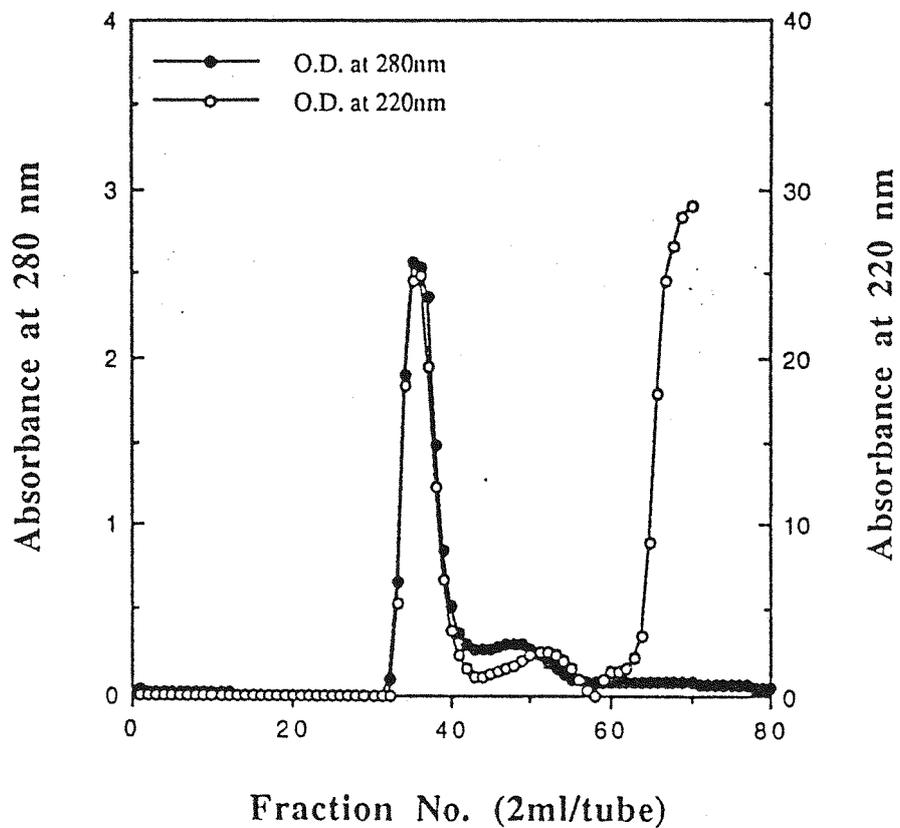
圖五：15% SDS-PAGE。



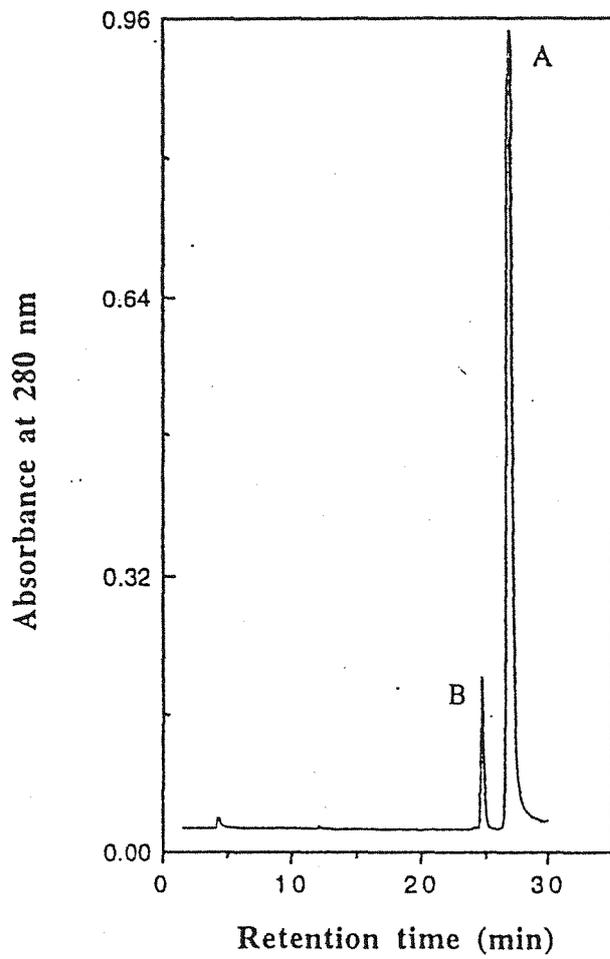
standard protein :

- phosphorylase b : 94,000 daltons
- ovine serum albumin : 67,000 daltons
- ovalbumin : 43,000 daltons
- carbonic anhydrase : 30,000 daltons
- soybean trypsin inhibitor : 20,100 daltons
- alpha-lactalbumin : 14,400 daltons

圖六：利用15% SDS-PAGE 測定 ALTI 之分子量。利用圖五之結果，求出標準蛋白之移行率後，在半對數紙上，以分子量對移行率作圖，畫出標準曲線，再求 ALTI 之移行率，以內插法估量其分子量。

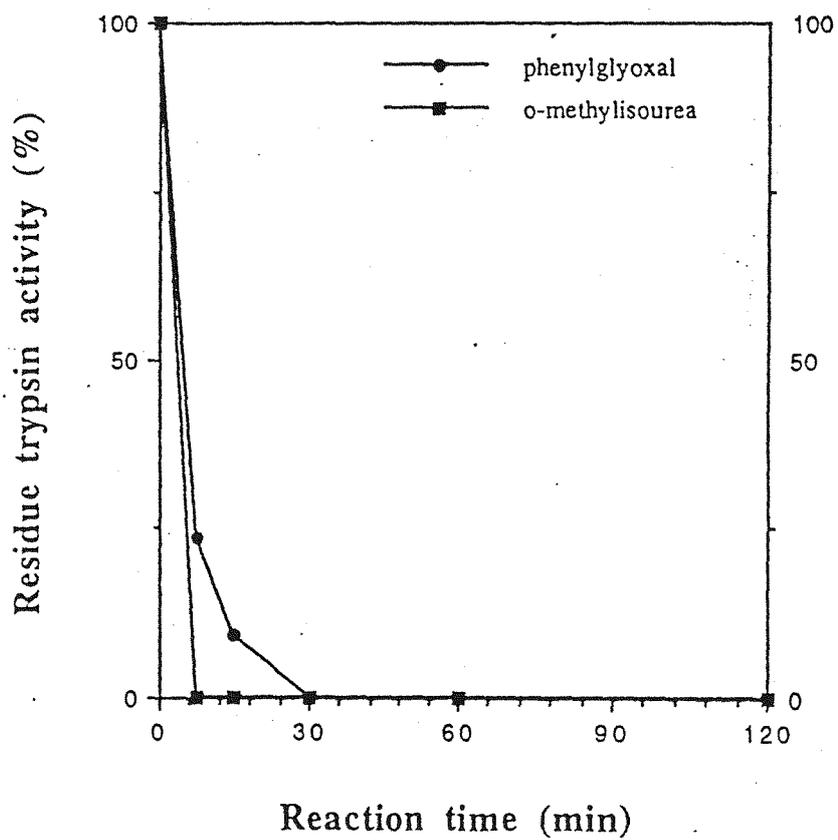


圖七：ALTI 經梭甲基化後，快速避光通入 Sephadex G-50，以 0.1 M 碳酸氫銨，pH8.0 為沖流液，同時測各分液之於 280 nm 及 220 nm 紫外光吸收值。

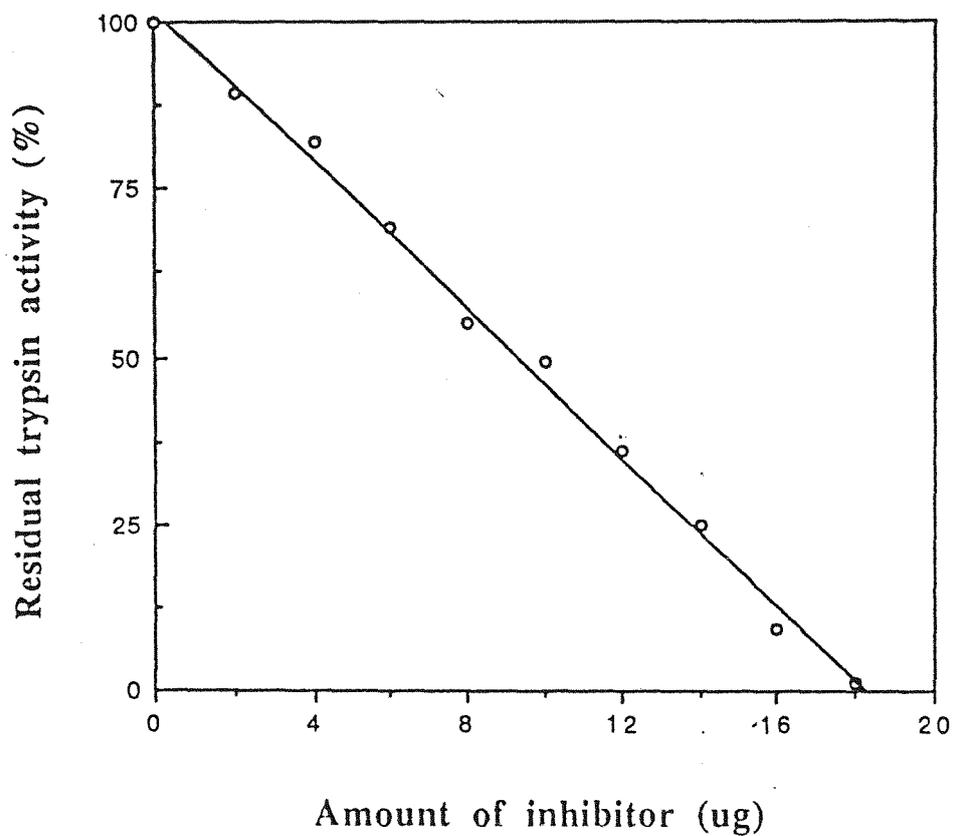


圖八：以 HPLC 來分析 ALTI-A 和 ALTI-B 次單元體。

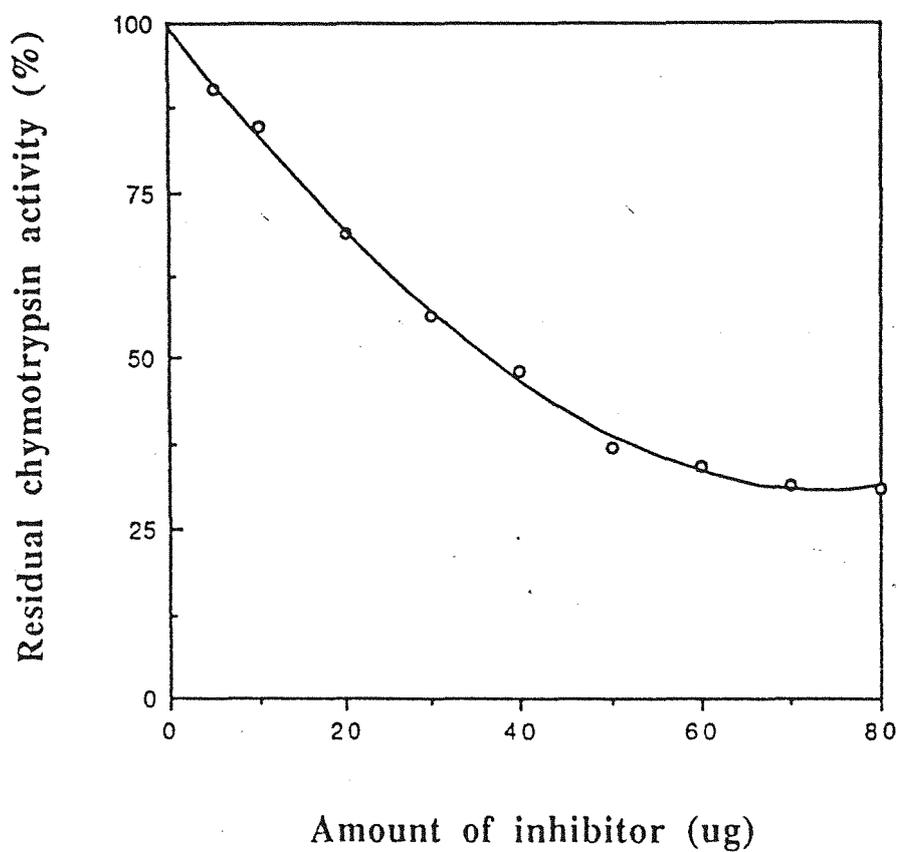
層析條件： column : C18 reverse phase column  
eluent A : ddH<sub>2</sub>O + 0.05% TFA  
eluent B : acetonitrile + 0.05% TFA  
gradient : 0-60% eluent B in 30 min  
flow rate : 1 ml/min



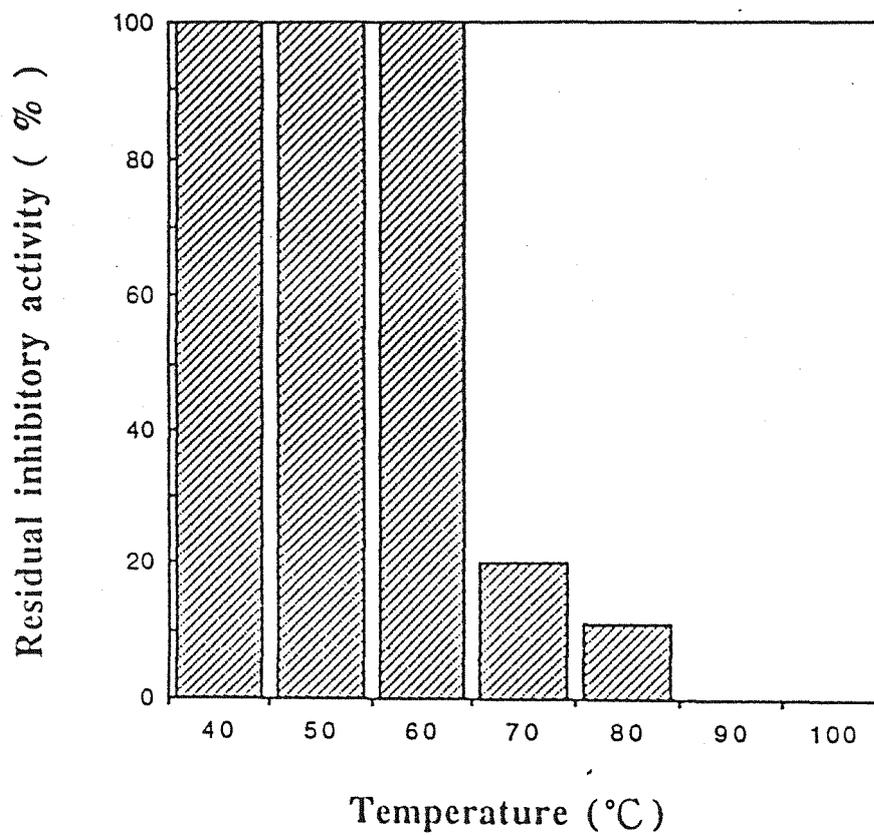
圖九：以 O-methylisourea 及 phenylglyoxal 修飾 ALTI。在修飾的過程，於不同時間取出被修飾物，作抑制活性之分析。



圖十：ALTI 抑制胰蛋白酶濃度效應。以不同量的 ALTI 對胰蛋白酶作用後，以 BApNA 為基質，分析 ALTI 對胰蛋白酶的抑制活性。



圖十一：ALTI 抑制 chymotrypsin, nargase, thermolysin, proteinase K 的濃度效應。以不同量的 ALTI 對上述 4 種酵素作用後，以 casein 為基質，分析 ALTI 對各種酵素的抑制活性。



圖十二：溫度對ALTI抑制活性的影響。ALTI 以各種溫度處理 30 分鐘後，以 BApNA 為基質，分析處理後之 ALTI的抑制活性。

ALTI-A	K E L L D A D G D I L R N G G T Y Y I -		
ACTI-A	K E L L D A D G D I L R N G G T Y Y I -		
ALTI-B	S D D H	S C K D L G I S I D D E N N R L -	
ACTI-B	D D E	S C K D L G I S I D D E N N R R -	
	L V V K D G D	P L A V R F E K A	A H R -
	L V V K D G H	P L A V R F E K -	A H R S G -

圖十三：ALTI 與 ACTI 部分胺基酸序列之比較。

1. Vogel, R., Trautscnold, I. and Werle, E. Natural Proteinase Inhibitors. P.41 Academic Press, New York (1968)
2. Liener, I. E. and Kakade, M. L. Toxic Constituents of Plant Foodstuffs. 7-68, Academic Press, New York (1969)
3. Decbary, J. M. Seed proteases and protease inhibitors. Econ. Botany. 24:113 (1970)
4. Birk, Y. Proteinase inhibitors from potatoes. Methods Enzymol. 45: 728-739 (1976)
5. Heinrichson, R. L. and Kezdy, F. J. Acidic cysteine protease inhibitors from pineapple stem. Methods Enzymol. 45:-740-751 (1976)
6. Sabeki, T. Matsuda, Y. Holzer, H. Purification and characterization of macromolecular inhibitors of proteinase a from yeast. Eur. J. Bio-chem. 47:325-332(1974)
7. Suda, h.; Aoyagi, T.; Takeuchi, T.; Umerawa, H. A. Thermolysin inhibitor produced by actinomycetes : phosphoramidon. The Journal of Antibiotics. 26:621-623 (1973)
8. Omichi, K. The reactive site of streptomyces subtilisin inhibitor. J. Biochem. (Tokyo) 87:483-489 (1980)
9. Read, I. W. and Haas, L. W. Baking quality of flour as affect by certain enzyme actions (V) KBrO<sub>3</sub> and enzyme activity,. Cereal Chem. 15:59 (1938)
10. Ham, W. E. and Sandstedt, R. M. A proteolytic inhibitory substance in the extract from unheated soybean meal, J. Biol. Chem. 154:505-506 (1944)
11. Kunitz, M. Crystallization of a trypsin inhibitor from soybean. Science 101:668-669 (1945)

12. Kunitz, M. Crystalline soybean trypsin inhibitor, *J. Gen. Physiol.* 29: 149-154 (1946)
13. Leiner, I. E. *Processed Plant Protein Foodstuffs.* 79-129, Academic press, New York (1958)
14. Leiner, I. E. Toxic factors in edible Legumes and their elimination. *Am. J. Clin. Nutr.* 11:281-298 (1962)
15. Rackis, J. J. Physiological properties of soybean trypsin inhibitors and their relationship to pancreatic hypertrophy and growth inhibition of rats. *Federation proc.* 24:1488-1493 (1965)
16. Mickelsen, O. and Yang, M. G. Naturally occurring toxicants in foods. *Federation proc* 25:104-123 . (1966)
17. Puzstai, A. Trypsin inhibitors of plant origin, their chemistry and potential role in animal nutrition. *Nutr. Abstr. Rev-* 37: 1 (1967)
18. Liener, I. E. Soyin. A toxic protein from the soybean, 1. inhibition of rat growth. *J. Nutr.* 49:527,-539 (1953)
19. Garlich, J. D. and Nesheim, M. C. 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 (1966)
20. Gertler, A., Birk, Y. and Bondi, A. 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 (1967)
21. Kortt, A. A.; Jermyn, M.A. Acacia proteinase Inhibitors. Purification and properties of the trypsin inhibitors from acacia elata seed. *Eur. J. Biochem.* 115:551-557 (1981)
22. Bösterling, B., Quast, U. Soybean trypsin inhibitor (kunitz) is double headed. Kinetics of the interaction of  $\alpha$ -chymotrypsin with each side. *Biochim. Biophys. Acta.* 657:58-72 (1981)
23. Umezawa, H. Structures and activities of protease inhibitors of microbial origin. *Methods Enzymol.* 45: 678-695 (1976)

24. Pubol5, M. H.; Bartelt, D. C. Greene, L. J. Trypsin inhibitor from human pancreas and pancreatic Juice J.. Biol. Chem. 249:2235-2243 (1974)
25. Barret, A. J. Stairkey, P. M., The interaction of a2- Macroglobulin with proteinases. Biochem. J. 133:709-724 (1973)
26. Ozawa, K. and Laskowski, M. The reactive site of trypsin inhibitors. J. Biol. Chem. 241:3955-3961(1966)
27. Scbiessler, H.; Fink, E. and Fritz, H. Acid-stable proteinase inhibitors from human seminal plasma. Methods Enzymol. 45:847-859 (1976)
28. Tryggvason, K., Hoyhtya, M., and Pyke, C. Type IV collagenases in invasive tumors. Breast Cancer Res. & Treat. 24: 209-218, 1993.
29. Odani, S.; Ono, T.; Ikenaka, T.; Proteinase inhibitors from a mimosoideae legume, Albizzia julibrissin. Homologous of soybean trypsin inhibitor (Kunitz). J. Biochem. 86:1795-1805 (1979)
30. Mteloun, B.; Cecbora, D.; Jonakova, V. 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 (1984)
31. Richardson, M. The proteinase inhibitors of plant and microorganisms. Phytochemistry 16:159-169 (1077)
32. Hass, G. M. Venkatakrishman, R. and Ryan, C. A. Homologous inhibitors from potato tuberes of serine endopeptidases and metalloproteinases. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 73:1941-1944 (1976)
33. Tan C. G.L.; Stevens, F. C. Amino acid sequence of lima bean protease inhibitor component IV. I. Isolation and sequence determination of the tryptic peptides. Eur. J. Biochem. 18:503-514 (1971)
34. Tan, C. G.L.; Stevens, F. C. Amino acid sequence of lima bean protease inhibitor component IV. II. Isolation and sequence determination of the chymotryptic peptides and the complete amino acid sequence. Eur. J. Biochem. 18:515-523 (1971)

35. Odani, S.; and Ikenaka, T. Studies on soybean trypsin inhibitors IV complete amino acid sequence and the antiprotease sites of Bowman-Birk soybean proteinase inhibitor. *J. Biochem.* 71:839-848 (1972)
36. Jessup, J. M. Cathepsin B and other protease in human colorectal carcinoma. *Amer. J. Pathol.* 145: 253-262, 1994.
37. Jone, P.A.; Declerck, Y.A. Destruction of extracellular matrices containing glycoproteins, elastin and collagen by metastatic tumor cells. *Cancer Res.* 40:3222-3227 (1980)
38. Burger, M.M. Proteolytic enzymes initiating cell division and escape from contact inhibition of growth. *Nature* 227:170-171 (1970)
39. Sefton, B. M.; Rubin, H. Release from density dependent growth inhibition by proteolytic enzymes. *Nature* 227:843-845 (1970)
40. Kuroki, T.; Drevon, C. Inhibition of chemical transformation in C3H/10T1/2 cells by protease inhibitors. *Cancer Res.* 39:2755-2761 (1979)
41. Yavelow, J.; Finlay, T. H.; Kennedy, A. R.; Troll, W. Bowman-Birk soybean protease inhibitor as an anticarcinogen. *Cancer Res.* 43: 2454-2459 (1983)
42. Laskowski, M., and Kato, I. Protein inhibitors of proteinases. *Ann. Rev. Biochem.* 49 : 593-626, (1986)
43. Billing, P. C., Habres, J. M., and Kennedy, A. R. Inhibition of radiation-induced transformation of C3H/10T1/2 cells by specific protease substrate. *Carcinogenesis* 11 : 329-332, (1990)
44. Billing, P. C. Habres, J. M., Liao, D. C. and Tuttle, S.W. Human fibroblast contain a proteolytic activity which is inhibited by the Bowman-Birk protease inhibitor. *Cancer Res.* 51 : 5539-5543, (1991)
45. Billings, P. C., and Habres, J. M. A growth-regulated protease activity that is inhibited by the anticarcinogenetic Bowman-Birk protease inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89 : 3120-3124, (1992)
46. Kennedy, A. R. prevention of carcinogenesis by protease inhibitors. *Cancer Res.* 54 : 1999s-2005s, (1994)

47. Moy, L. Y. and Billings, P. C. A proteolytic activity in a human breast cancer cell line which is inhibited by the anticarcinogenic Bowman-Birk protease inhibitor. *Cancer lett.* 85 : 205-210, (1994)
48. Redwood, S. M., Liu, C. S., Weiss, R. E., Hodge, D. E., and Droller, M. J. Abrogation of the invasion of human bladder tumor cells by using protease inhibitors. *Cancer* 69 : 1212-1219, (1992)
49. Axen, R. and Ernback, S. Chemical fixation of enzyme to cyanogen halide activated polysaccharide carrier. *Eur. J. Biochem.* 18:351-360 (1971)
50. Sugiura, M., Ogiso, T., Yakenti, K., Tamura, S., and Ito, A. Purification of dexatranase from *Penicillium funiculosum* and its enzymatic properties. *Biochem. Biophys. Acta.* 328: 407-417 (1973)
51. Kanamori, M. Occurrence of a trypsin inhibitor in eggplant exocarps. *J. Nutr. Sci. and Vitatminol* 21: 421-428 (1975)
52. Erlanger, B. F., Kokowsky, N., and Cohen, W. The preparation and properties of two new chromogenic substances of trypsin. *Arch. Biochem. and Biophys.* 95:271-278 (1961)
53. Norioka, S., Omicbi, K., and Ikenaka, T. Purification and characterization of protease inhibitors from peanuts (*Arachis hypogaea*) *J. Biochem.* 91:1427-1434(1982)
54. Weber, K., and Osborne, M. The reliability of molecular weight determination by dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 244: 4406-4412 (1969)
55. Gabriel, O., Analytical disc gel electrophoresis. *Methods Enzymol.* 22:564-578 (1971)
56. Matsubara, H. , and Sasaki, R. N. High recovery of tryptophan from acid hydrolysis of protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 35:175-181 (1969)
57. Hayashi, K., Takehisa, T., Hamato, N., Takano, R., Hara, S., Miyata, T., and Kato, H. Inhibition of serine protease of the blood coagulation system by squash family protease inhibitors. *J. Biochem.* 116 : 1013-1018 (1994)

58. Liao, T. H., Salkinow, J., Moore, S. and Stein, W. H. Bovine pancreatic deoxyribonuclease A. *J. Biol. Chem.* 248:1489-1495 (1973)
59. Habeeb, A.F.S.A. Reaction of protein sulfhydryl groups with Ellman's reagent. *Methods Enzymol.* 25:457-464 (1972)
60. Crestfield, A. M.; Moore, S.; Stein, W. H. The preparation and enzymatic hydrolysis of reduced and S-carboxymethylated proteins. *J. Biol. Chem.* 238:622-627 (1963)
61. Kortt, A. A. Specificity and stability of the chymotrypsin inhibitor from winged bean seed (*Psophocarpis tetragonolobus* (L)Dc.) *Biochem. Biophys. Acta.* 657: 212-221 (1981)
62. Gruen, L. C.; Tao, Z. J.; Kortt, A. A. Stability and physicochemical properties of a trypsin inhibitor from winged bean seed (*Psophocarpus tetragonolobus* (L)Dc.) *Biochem. Biophys. Acta* 791:285-293 (1984)
63. Mihayi, E. Physicochemical studies of Bovine fibrinogen IV ultraviolet absorption and its relation to the structure of the molecule. *Biochemistry.* 7:208-223 (1968)
64. Chase, T.; Shaw, E. Titration of trypsin, plasmin and thrombin with P-nitrophenyl p'-guanidinobenzoate-HCl. *Methods Enzymol.* 19:20-27 (1970)
65. Klee, W. A. and Richards, F. M. The Reaction of O-methylisourea with bovine pancreatic ribonuclease. *J. Biol. Chem.* 229:489-504 (1957)
66. Kassel, B. and Chow, R. B. Modification of the basic trypsin inhibitor of bovine pancreas. The  $\alpha$ -amino groups of the lysine and the amino-terminal sequence. *Biochemistry.* 5:3449-3532 (1966)
67. Rogers, T. B., Borresen, T., and Feeney, R. E. Chemical modification of the arginines in transferrins. *Biochemistry.* 17:1105-1109 (1978)
68. Cheung, S. T. and Fonda, M. L. Reaction of phenylglyoxal with arginine. The effect of buffers and pH. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 90:940-947 (1979)
69. Sokolovsky, M., Riorden, J. F., and Vallee, B. L. Tetranitromethane, a reagent for the nitration of tyrosyl residues in proteins. *Biochemistry.* 5:3582-3589 (1966)

70. Sakato, K. , Tanaka H., and Misawa, M. Broad specificity proteinase inhibitors in *Scopolia Japonica* ( Solanaceae) cultured cells. Eur. J. Biochem. 55:221-230 (1975)
71. Laskowski, M. Jr. and Sealock, R. W. The Enzymes (Boyer, p ed) 3:375. Academic Press, New York (1971)
72. Liu, C. S., Lin, C. C., Chen, J. M., Chang, C. H., and LO, T.B. A convenient amino acid analysis of protein electroblotted onto poly - vinylidene difluoride membrane from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel- a direct in situ derivation of amino acids after gas-phase hydrolysis. J. Chin. Biochem. Soci. 22 : 69-76 (1993)
73. Liener, I. E. and Kakade, M. L. Toxicants occuring naturally in foodstuffs. Academic Press, New York. (1969)
74. Ryan, C. A. Proteolytic enzymes and their inhibitor in plants. Ann. Rev. Plant Physiol. 24 : 173 (1973)
75. Heywooci, V. H. Chemotaxonomy of the Leguminosae (Harborn, J. B., Boulter, D. and Turner, D. L.)285-308.. Academic Press, London and New York (1971)
76. Green, T. R. and Ryan, C. A. Wound-Induced Proteinase Inhibitor in Plant Leaves: A Possible Defense Mechanism against Insects. Science. 175:776-777 (1972)
77. Laskowski, M. Jr. and Laskowski, M. SR. Naturally occuring trypsin inhibitors. Advances in Protein Chem. 9, 203 (1954)
78. Neurath, H., Walsh, K. A., and Winter, W. P. Relief by modification of carboxylate groups of the calcium requirement for the activation of trypsinogen. Science. 158:1638-1644 (1967)
79. Liu, W. H. Feinstein, G., Osuga, D. T., Haynes, R. and Feeney, R. E. Modification of arginines in trypsin inhibitors by 1,2-cyclohexadio-ne. Biochemistry. 7:2886-2892 (1968)
80. Krahn, J. and Stevens, F. C. Glutamate decarboxylase, substrate specificity and inhibition by carboxylic acid. Biochemistry. 11: 1304-1309 (1972)

81. Belew, M., and Eaker, D. The trypsin and chymotrypsin inhibitors in chick peas. Identification of the trypsin reactive site, partial-amino acid sequence and further physicochemical properties of the major inhibitor. *Eur. J. Biochem.*, 62:499-508 (1976)
82. Wilson, K. A. and Laskowski, M. Sr. 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 (1975)
83. Cherrenka, C. H. and Wilcox, P. E. Chemical derivatives of chymotrypsinogen II reaction with O-methylisourea, *J. Biol. Chem.* 222:635-647 (1956)
84. Habeeb, A.F.S.A. and Pennett, J. C. Enzymatic and immunochemical properties of lysozyme, evaluation of several amino group reversible blocking reagents. *Biochemistry*. 9:4934-4944 (1970)
85. Takaiashi, K. The reaction of phenylglyoxal with arginine residues in proteins. *J. Biol. Chem.* 243:6171-6179 (1968)

## 第二部份：S-180 癌細胞中蛋白酵素分析

Analysis the protease in sarcoma 180 cells

## 中文摘要

老鼠 Sarcoma-180 細胞是一可移殖的腫瘤細胞，它可被移殖於老鼠的腹腔或皮下，形成 S-180 腹水癌細胞或堅硬腫瘤塊；S-180 細胞被廣泛的應用於很多測試抗癌活性的實驗中，其模式為觀察各種自然物或化學物施用於接種 S-180 細胞之老鼠後，老鼠之生命期是否變化，依此判斷這些成份是否具有抗癌之作用，或同時與其它癌細胞株做比較。

本研究中，我們利用 zymography 的分析方法首先確認了存在於 S-180 細胞質中的蛋白酵素，其分子量約為 110 kDa、120 kDa 和 65 kDa。當 S-180 細胞均質液以 1000 : 1 (w/w) 的胰蛋白酶 (trypsin) 處理一個小時後，可發現 65 kDa 之量增加，並且出現分子量約 63 kDa 和 43 kDa 兩個具活性之蛋白酵素。經不同酸鹼值之反應條件分析，當酸鹼值為 9 時，43 kDa 之蛋白酵素具有最大活性。以不同抑制劑加入反應溶液中一起 incubation，發現 65 kDa 之蛋白酵素會被 EDTA 抑制活性，故此 65 kDa 之蛋白酵素其為一金屬型蛋白酶；而 43 kDa 之蛋白酵素活性則不會被 EDTA 抑制，亦不會被 DLTI、TLCK 等抑制劑抑制。



## 英文摘要

Sarcoma -180 cell is a transplantable tumor cell, which can be transplanted into the abdominal cavity or subcutis . Then, it form S-180 ascite tumor cell or solid tumor. S-180 cell was widely used to assay antitumor activity of anticancer substances including natures and chemicals. Its models were that observing the span life of the mouse bering S-180 cell treated with anticancer substances, or being compared with other cancer cell lines in response to agents.

In this study, we have identified some proteases in S-180 cell homogenate preparations by zymogram protease assay . There are 3 active proteases without activation were detected with masses of about 120kDa, 110kDa and 65 kDa. After treated with trypsin, the S-180 cell homogenatepreparations appeared new two proteases with activity at masses about 61 kDa and 43 kDa . Protease activity of the 43 kDa protease is maximal at pH 9.0 and inhibited by ALTI, ACTI and DLTI but unaffected by EDTA , indicating that this enzyme is a serine protease. Protease activity of that protease with masses about 65 kDa is inhibitd by EDTA, indicating that this enzyme is a metalloprotease.

## 緒 言

蛋白酵素對 peptide 鍵的斷裂作用是蛋白質最常見及重要的酵素修飾作用之一。酵素性的蛋白水解作用是與蛋白質之消化同時存在，故先前之生理學家和生化家對人類及動物之蛋白質消化過程具很大的興趣，因而胰臟的和胃部所分泌的消化性蛋白酵素之特性、結構和功能被研究的很透澈。而更進一步，有關蛋白酶的動力學研究、專一性和抑制作用與其氨基酸序列、X-光結構被詳細分析比較，歸納了蛋白酵素之活性位置，並依此推論其作用機制，再依此作用機制作蛋白酵素分類。近年來，科學家之注意力集中於蛋白酵素在很多的生理反應過程所扮演的調節角色，其範圍包含了新合成 polypeptide chains 的組合、賀爾蒙和酵素先驅物之發展、受精過程及很多細胞內重要之功能。

生化國際協會( International Union of Biochemistry ) 將蛋白酵素依作用機制分成四類：1. serine protease、2. cysteine protease、3. aspartic protease 和 4. metalloprotease，此四類可再細分成六屬，其中 serine protease 包含兩個不同之屬：哺乳類絲氨酸蛋白酵素 (mammalian serine protease) (例如 chymotrypsin、trypsin、elastase) 和細菌類絲氨酸蛋白酵素 (bacterial serine protease)；metalloprotease 包含兩個相異之屬：mammalian pancreatic carboxypeptidase 和 bacterial thermolysin，雖然它們同是含鋅的金屬酵素，活性位置之配位亦相似，但在化學結構上則迥然不同。Cysteine proteases 包含好幾種哺乳類 lysosomal cathepsin 和存於植物中的 papain 及 actinidin。Papain 是此屬中被研究最透澈者，最主要的催化氨基是第 25 位之

cysteine，其作用如同 chymotrypsin 之第 195 位之 serine，而其催化過程是經由 thiol ester 中間物的形成，再藉著側鏈 159 位 histidine 和 158 位 aspartic acid 的幫助而達成。Aspartic protease 包含了存在於細菌 penicillopepsin，哺乳類中的 pepsin、renin、chymosin。

蛋白酵素參與之正常生理作用非常繁多。曾有研究指出，在未轉型 (non-transformed) 和經放射線-轉型的 C3H/10T1/2、human fibroblast 和 human bladder epithelial cells 都觀察到同時存在的蛋白酵素活性<sup>(17, 23, 40)</sup>。若將培養於 serum-free medium 中的 nongrowing 細胞與對數成長細胞做蛋白酵素活性之比較，則觀察到蛋白酵素活性程度有明顯的差異，即對數成長細胞之蛋白酵素活性程度有顯著增加，此結果意謂著蛋白酵素與生長是有相關性。更有證據指出此與生長有相關性蛋白酵素因應 mitogen 而反應，當以 PMA 處理細胞後，可見到蛋白酵素增加 5-10 倍之多<sup>(7)</sup>事實上，PMA 可以誘導蛋白酵素活性，特別是 plasminogen activator。

如人體內存在著許多蛋白酵素原，有正常生理反應之蛋白酵素原，如擴張血管之 angiotensinogen、prekallikrein，賀爾蒙類的 proinsulin、proglucagon 和酵素 protyrosinase、prorenin 等；有因應外來物質的蛋白酵素原，如有關消化的 pepsinogen、trypsinogen，與凝血相關的 prothrombin、fibrinogen，亦有與生物之發育或修護相關之蛋白酵素原，如與發展有關之 procollagenase、proacrosin，與纖維溶解相關之 plasminogen。又如一些分泌性之蛋白質，在合成過程即包含有一段 signal peptide，以蛋白酵素原的型態出現，當其被運送到細胞外，通過細胞膜時，存在於膜上的蛋白酵素 (signal peptidase) 會認知此 peptide，並將此 signal peptide 切斷。這些蛋白酶原的活化都需要經所謂的“limited proteolysis”步驟而且須有一或多種的蛋白酶參

與。

又以賀爾蒙的形成為例，賀爾蒙的形成亦需要蛋白酵素的參與。peptide hormones 最先被合成時，常以大份子的 preprohormone 先驅物的型式，而須要蛋白水解過程以形成有活性的 peptide<sup>(29)</sup>。在賀爾蒙形成過程之蛋白水解作用中，屬於 (1) aspartyl protease 有 proopiome-lanocortin converting enzyme (PCE)、somatostatin -28 generating enzyme，而 PCE 被發現存在於牛的 pituitary intermediate and neural lobe secretory granules<sup>(85)</sup>，是一個 70 kDa glycoprotein，其會水解 POMC 而產生 ACTH，beta-LPH，beta-endorphin；(2)cysteine proteases 如 prohormone thio protease (PTP) 和 dynorphin converting enzyme，PTP 會使 proenkephalin 形成 enkephalin<sup>(86, 87)</sup>，而 dynorphin converting enzyme 會切 dynorphin B-29 之 arginine residue 形成 dynorphin B；(3) metalloproteases 包含有 dibasic 和 monobasic 具選擇性的 endopeptidases，曾於老鼠大腦確認一 somatostatin-28 generating metalloendo-protease 會專一性的切斷 NH<sub>2</sub>-terminal 之 arginine residue<sup>(88)</sup>；(4) serine proteases 則有 prosomatostatin convertase，adrenal trypsin-like enzyme 和 atrial granule protease 等，而此類 serine proteases 曾由分離的老鼠的小腸<sup>(89)</sup>、牛動脈<sup>(90)</sup>和牛 chromaffi granules<sup>(91)</sup>的分泌小泡 (secreted vesicles) 中被偵測到。

然而某些疾病卻是因組織內之蛋白酵素不正常的增加，如 neutrophil elastase 被認為是 cystic fibrosis 患者肺臟傷害之主要媒藉物質<sup>(75)</sup>；rheumatic disease 之主角為 collagenase 和 stromelysin<sup>(76)</sup>；及癌瘤之侵犯轉移<sup>(3, 8, 9, 28, 62, 63, 70)</sup>。

所謂“侵犯”是表示細胞能穿透分隔組織腔的屏障如 basement membrane，interstitial stroma，和 intercellular junctions。侵犯的過程

發生在胚胎時期和成人器官內，如 trophoblast implantation，血管的生成，白血球於發炎地區溢出血管和受傷組織的修復。其它的侵犯過程如不正常的風濕性關節炎和腫瘤的發展<sup>(38, 48)</sup>。癌瘤的生長包含了四個步驟<sup>(18)</sup>：(1) 侵犯 (invasive)，癌細胞侵入臨近組織；(2) 血管生成 (angiogenesis)，微血管上皮細胞侵入此癌瘤；(3) 進入血管 (intravasation)，癌細胞滲入微血管床 (capillary bed)；(4) 從血管溢出及轉移 (extravasation & metastasis)，癌細胞離開血管而在原發腫瘤的其它地區形成癌瘤。

細胞外基質 (ECM) 藉由細胞的接觸、mitogenesis 的調節和細胞的分化決定組織的架構，並且扮演一具惡有選擇性的大分子濾膜之角色<sup>(92)</sup>。正常情況下它不會讓大分子蛋白質或者細胞通過，然而在組織重整或侵犯過程，包括發炎、傷口修補、血管生成或是腫瘤，則 BM 會允許細胞移動。良性的腫瘤只有 parenchymal tissue 不正常增生，基本上並不會影響 BM 的完整性。相對的，惡性腫瘤往往會瓦解 BM。而 BM 的瓦解可能因 (1) 合成減少，(2) 裝配不正常，(3) 增加組成成份的降解或 (4) 此三種因素同時存在。本篇中，我們著重於組成成份降解的探討。1925 年 Fischer<sup>(93)</sup> 提出：tumor explant 會將 fibrin clot 融解的現象是與癌瘤生長時組織降解有關聯。他假設有一種 'lytic agent' 會將與將細胞緊密結合的 'fibrin stroma' 液化。之後，Fischer 與其同伴提出 tumor explant 會將 fibrin clot 融解是因為 PA 把 plasmin 活化。然真正對 PA 和癌症之關係有興趣是在 1970 年代初，那時發現到：利用一些 oncogenic viruses 將培養的細胞 transformed，會導致胞外蛋白酶活性戲劇性的增加，而這些蛋白酶即是 PA<sup>(94, 95)</sup>。其後，亦陸續發現其它的蛋白酶包括 serine，metallo-，和 cysteine 等類之蛋白酶也與 transformed 和癌細胞有關聯<sup>(30, 31, 52)</sup>。

細胞外基質的主要成份是 collagen，屬於纖維蛋白，為哺乳類動物體內最多量的蛋白質，佔總蛋白質量的百分之二十五<sup>(10)</sup>。與此分解相關的酵素包含有：matrix metalloproteinases (MMPs)，如 stromelysins，gelatinases 和 matrilysin；或 serine proteinase，如 plasmin<sup>(15)</sup>；及 lysosomal proteinases cathepsins B 和 D<sup>(13, 30)</sup>。細胞外基質的分解是一連串複雜蛋白酵素的作用，而分解不同型 collagen，所需要的蛋白酵素也不同而且有可能需要二種以上<sup>(25, 32, 61)</sup>。

Serine protease 包含有 plasminogen activators (PAs), leucocyte elastase 和 cathepsin G。其中 PAs 被研究的最透徹，有證據指出其與細胞的侵犯有關連<sup>(12, 42, 43)</sup>。PAs 會轉換 Plasminogen 為 Plasmin；plasmin 可分解 fibrin、fibronectin、laminin 等但不能分解 collagens 和 elastin。然而 PAs 會活化某些 MMPs 的前趨物<sup>(81)</sup>或潛伏型的 elastase<sup>(14)</sup>。

MMPs 包含有 8 個結構相關的酵素如 type IV collagenase 72 kDa, 92 kDa、interstitial collagenases、stromelysins 等<sup>(63, 82, 83, 84)</sup>，它們都是以潛伏型之形式被分泌，同樣具有一個 Zn<sup>++</sup>-binding 活性位置，且可被 TIMPs 所抑制。Type IV collagenase 72 kDa (gelatinase A) 和 92 kDa (gelatinase B) 是目前已知此類酵素含量最多者，此兩個蛋白酵素可利用 fibronectin-like domain 與 collagen 和 gelatin 結合。在 mesenchymal tissue 可看到 72 kDa type IV collagenase 大量表現，這指出 72 kDa type IV collagenase 在 extracellular matrix 的重整有它的意義存在，不僅在底膜的更新而且也可除去 denatured proteolytic fragments of fibrillar collagen molecules。肺泡 macrophage，多形核白血球會分泌 92 kDa IV collagenase，是因為肺泡 macrophage，多形核白血球利用這酵素在體內穿透不同組織<sup>(66)</sup>。Interstitial collagenases 包括

fibroblast procollagenase ( 57 kDa )<sup>(77)</sup>和 neutrophil procollagenase ( 85 kDa )<sup>(78)</sup>, 此類 collagenases 會降解 I, II, 和 III 型的 fibrillar collagens。Stromelysins 分子量約 53-57kDa<sup>(3, 66, 79)</sup>, 可以降解 IV 型之 collagen 以及 extracellular matrix 中非 collagens 成份如 laminin 和其它的 proteoglycans。總之, MMPs 在生理 pH 值下, 它們能將結構蛋白如 collagen、proteoglycan、fibronectin 和 laminin 崩解, 而這些成份是維持結締組織完整性所必需。

蛋白酵素抑制劑 (protease inhibitors) 可分成兩個種類: 一、具對活性位有專一性、低分子量的抑制劑, 此類抑制劑會不可逆性的修飾活性位之氨基酸, 二、自然發生的蛋白質蛋白酵素抑制劑, 大部份此類抑制劑有若假的受質。第一類中最著名者為 serine protease 抑制劑, 即 DFP ( diisopropyl phosphofluoridate ) 和 PMSF ( phenylmethanesulphonyl fluoride ), 此兩者會與 serine proteinase 活性位之 serine 結合; 而 chloro- methyl ketone 的氨基酸或 peptide 衍生物會與 histidine 反應。Aspartic protease 會被 diazoacetyl 化合物去活化。Metalloprotease 往往被金屬螯合物抑制。

而自然界中屬蛋白質類之蛋白酵素抑制劑已被從動物、植物及微生物中分離得到, 它們參與動植物體內之正長生理作用。如馬鈴薯和蕃茄中含有抑制 chymotrypsin 和 carboxypeptidase 的蛋白酵素抑制劑成份, 其表現是對昆蟲叮咬的反應, 用以抑制昆蟲產生的蛋白酵素。

會製造 PA 的細胞一般也會表現 PA 抑制劑<sup>(1)</sup>, 此類抑制劑之表現, 一如 PA 之合成, 會受到 tumor promoter 和生長因子的調控。雖然 PA 可和好幾種 serine protease inhibitor (serpin) 形成複合物, 然而在生體內只有 PAI-1、PAI-2 和 PN-1 這三種有抑制作用<sup>(1, 99)</sup>。PA 抑制劑參與了 u-PA 的代謝<sup>(71)</sup>且其確實可以抑制癌細胞的轉移<sup>(1, 16, 24)</sup>。

TIMPs (tissue inhibitors of metalloproteinases) 目前已知有 TIMP-1 及 TIMP-2 二屬<sup>(22, 96, 97)</sup>，它們可以專一性的抑制 72 kDa 和 92 kDa 蛋白酵素<sup>(34)</sup>。比較人類結腸癌細胞與癌病變相近的正常黏膜細胞，可觀察到 TIMP-1 濃度增加，然而 TIMP-2 並未有增加現象。又若將 TIMP-1 基因的表現阻斷，可見到侵犯及轉移能力，但此現象亦可因外加入 TIMP-1 而抑制<sup>(98)</sup>。

Cystatins 是 cysteine proteinases 之抑制劑<sup>(2)</sup>，它可分為三類，(1) CystatinA 和 B, (2) chicken A, S, 和 clostrum cystatins , (3) 第三型 cystatin, 或 L-,H- 和 T-kininogen 。

很多的研究指出：欲維持這些蛋白質的正常生理功能，蛋白酵素和蛋白酵素抑制劑的平衡是非常重要的。而增加蛋白酵素的表現確實與癌的生成和癌組織的侵犯有關連<sup>(4, 39, 44, 45, 51, 53, 57, 58, 59, 62, 80)</sup>。若要減少癌瘤的發生或轉移可以(1)降低相關蛋白酵素基因的表現。有報告指出利用基因方法 down-regulation protease 的表現，會使癌細胞株減少侵襲和轉移的現象<sup>(19)</sup>；(2) 提高蛋白酵素抑制劑的表現。將 TIMP-2 之 cDNA transfect 到具侵犯及轉移能力之老鼠細胞時，可見到 MMPs 的活性降低並且抑制了侵犯及轉移能力<sup>(72)</sup>，Recombinant TIMP-2 亦可抑制癌細胞株的侵犯及轉移能力<sup>(73)</sup>；(3)多攝取自然界之蛋白酵素抑制劑<sup>(5, 6, 21, 33, 35, 36, 50, 55, 56, 67, 68, 69)</sup>。

老鼠 Sarcoma-180 細胞是一可移殖的腫瘤細胞，它可被移殖於老鼠的腹腔或皮下，而形成 S-180 腹水癌細胞或堅硬腫瘤塊。因其可大量培養，故可藉由研究其內含之蛋白酵素或蛋白酵素抑制劑，進一步探討人類癌瘤生成之因；尋找癌病之標誌以及預防並控制癌瘤之方法。

## 縮 寫

- ACTI : *Acacia confusa* trypsin inhibitor  
ALTI : *Albizzia lebbek* trypsin inhibitor  
DLTI : *Dolichos lablab* trypsin inhibitor  
PA : Plasminogen activator  
PMSF : Phenyl methyl-sulfonyl fluoride  
S-180 : Sarcoma 180  
SDS : Sodium dodecyl sulfate  
TEMED : N,N,N',N'-Tetramethylene diamine  
TIMP : Tissue inhibitor of metalloproteinase  
TLCK : N-p-Tosyl-L-Lysine chloromethyl keton  
TPCK : L-1-p-Tosylamino-2-phenyl-ethyl chloromethyl keton  
Tris : Tris(hydroxymethyl)-aminomethane

## 實驗材料

- 1.S-180 細胞
- 2.ACTI , ALTI , DLTI 為本實驗室純化。
- 3.Acrylamide 購自美國 Sigma 公司。
- 4.Bio-Rad protein assay Dye reagent 購自公司。
- 5.Coomasie brilliant blue R250 購自美國 Serva 公司。
- 6.Gelatin( Porcine type A) 購自美國 Sigma 公司。
- 7.Sodium dodecyl sulfate 購自美國 Serva 公司。
- 8.Trypsin(type III , from bovine pancreas) , chymotrypsin , thermolysin (type X) nargase (typeXXVII) 購自美國 Sigma 公司。
- 9.PMSF , TLCK 購自美國 Sigma 公司。
- 10.TPCK 購自美國 Adrich Chem.公司。
- 11.Tris-HCl 購自德國 Merck 公司。
- 12.儀器
  - Amersham Life Science Hybridization Oven/Shaker
  - Beckman DU 640 spectrophotometer
  - Beckman GS-6R Centrifuge
  - Bio-Read Mini-Protean II
  - Fargo 旋轉動力器
  - Hybrid HB-SHK 1 shaker
  - Wheaton 10 ml 細胞研磨器

# 實驗方法

## 一、細胞質液之製備

(一) 由攜帶 S-180 細胞之老鼠的腹腔中抽取腹水，首先將腹水在 2,500 rpm 下離心五分鐘，離下細胞，以 PBS 洗 2 次，pellet 以 2 倍 pellet 體積之 PBS resuspension，在 4 °C 下以研磨器將細胞研碎，靜置 10 min，使蛋白酶溶於 PBS 中，30,000 x g 離心 30 分鐘，取上清液。以 Bradford protein assay 方法測上清液之蛋白量，測完後依需要量分裝於 eppendorf，貯存於 -70 °C。

## 二、Gelatin-SDS-polyacrylamide gel 之製備

本實驗所用板膠的濃度為 8%，其組成如下：

	separating gel	stacking gel
1.5M Tris-HCl, pH 8.8	2.5 ml	0
0.5M Tris-HCl, pH 6.8	0	0.65 ml
30% acrylamide-0.8% bis-acrylamide	2.7 ml	0.35 ml
Ammonium persulfate (10 mg/ml)	0.5 ml	0.18 ml
10% SDS	100.0 ul	25.0 ul
Gelatin (2%)	0.5 ml	0
d H <sub>2</sub> O	3.7 ml	1.35 ml
TEMED	10.0 ul	6.0 ul

gelatin-SDS-polyacrylamide 板膠之配製方式如同一般之 SDS-polyacrylamide 板膠，不同處為 separating gel 內含 0.1% 之 gelatin。

## 三、洗滌溶液(wash buffer) 之配製

取 2.5 ml Triton X-100 加入 97.5ml 之蒸溜水。此溶液之作用是為使 gel 上之蛋白 renature 。

#### 四、反應溶液 (reaction buffer) 之配製

100 mM Tris-HCl ( pH 8.0 ) , 10 mM CaCl<sub>2</sub> 水溶液。

#### 五、蛋白酵素活性之測定<sup>(46)</sup>

取適量樣品加入適量 electrophoresis sample buffer 後，將其注入 8% 板膠之 well 中，做電泳分析。當 loading dye 移動至板膠之最下方，即結束電泳過程，將板膠移至 200ml 的 wash buffer 中，在室溫下浸泡搖晃 30 分鐘後，更換一次 wash buffer，並再搖晃 30 分鐘，此步驟是為使蛋白酵素 renature。將板膠移至反應溶液中，在 37°C 反應 12 個小時，以染色液中止反應並染色，若具有蛋白酵素活性處，則該地方不能被染上顏色，而形成一透明帶，此乃因蛋白酵素已將此處之 gelatin 水解了，故不能染上顏色。

#### 六、胰蛋白酵素活化蛋白酵素活性之測定<sup>(46)</sup>

取樣品，含 50 ug 蛋白量，加入 1 ul trypsin (50 ug/ml) ，於室溫下 incubation 一小時，加入適量 electrophoresis sample buffer ，其餘步驟皆與蛋白酵素活性之測定的步驟相同。

#### 七、pH 值對蛋白酵素活性之影響<sup>(41)</sup>

取適量樣品加入適量 electrophoresis sample buffer 後，將其注入板膠之 well 中，做電泳分析。當 loading dye 移動至板膠之最下方，即結

束電泳過程，將板膠移至 200 ml 的 wash buffer 中，在室溫下浸泡並搖晃 30 分鐘後，更換一次 wash buffer，並再搖晃 30 分鐘，將板膠移至反應溶液中，此反應溶液以系列 pH 質緩衝液<sup>(20)</sup>取代，同樣加入 10 mM CaCl<sub>2</sub>，待其反應 12 小時，以染色液中止反應並染色。

#### 八、蛋白酵素抑制劑對蛋白酵素活性之影響

與蛋白酵素活性之測定的步驟同，然反應溶液中加入各種不同之蛋白酵素抑制劑，並使其最終濃度為：

TI (trypsin inhibitors) : 10 ug/ml

EDTA : 20 mM

PMSF : 1 mM

TLCK : 1 mM

TPCK : 1 mM。

PMSF、TLCK、TPCK 皆須新鮮配製，PMSF 須先溶於 isopropanol；TLCK 可溶於水，須存於 pH 值小於 6 時才較安定，其存於 pH > 7 時，於 30 分鐘即被破壞；TPCK 須溶於 ethanol。

# 實驗結果

本實驗中每一反應之細胞質液蛋白質質量為 50 ug ; trypsin 為 1 ul 之 50 ug/ml 溶液。

## 一、蛋白酵素活性的測定

利用 gelatin-containing zymography 的方法，分析 S-180 細胞均質液，我們發現了幾條具蛋白酵素活性的電泳帶，分子量約 63 kDa 及 90 kDa 以上。當將細胞均質液以胰蛋白酵素處理後，同樣經 gelatin-containing zymography 的方法分析，除了原先之電泳帶外，可發發現一條新的、具蛋白酵素活性的電泳帶，其分子量約 43 kDa。(圖一)

## 二、S-180 細胞均質液內蛋白酵素性質之確定

S-180 細胞均質液做 gelatin-containing zymography 的分析，當 incubation 時，於反應溶液中加入蛋白酵素抑制劑，如 PMSF、TLCK、EDTA 及實驗室所純化的 ACTI、ALTI 和 DLTI。我們發現未經 trypsin 處理即活化之 63 kDa 之蛋白酵素，可被 EDTA 所抑制，其它的蛋白酵素抑制劑對此 63 kDa 之蛋白酵素沒有影響，所以我們可知道此蛋白酵素應是屬於 metalloprotease。而經 trypsin 處理後才活化的 43 kDa 蛋白酵素對 EDTA 無反應，此結果意謂著此 43 kDa 蛋白酵素與 collagenases 不同，因 collagenases 會被 EDTA 和其它金屬離子螯合物所抑制。(圖二)

### 三、活化 43 kDa 蛋白酵素活性之專一性

為了瞭解是否有其它的酵素亦能活化此 43 kDa 蛋白酵素的活性，我們以 chymotrypsin、nargase 或 thermolysin 處理 S-180 細胞均質液，處理方法如同 trypsin，結果此三種酵素對 43 kDa 蛋白酵素的活性皆沒有活化作用，故 trypsin 對活化此 43 kDa 蛋白酵素的活性有專一性。（圖三）

### 四、pH 值對 43 kDa 蛋白酵素的影響

為了更進一步瞭解 43 kDa 蛋白酵素的性質，何種 pH 質下此蛋白酵素能具最大的作用力，以不同 pH 值 (pH 4.0 - pH 10.0) 的緩衝液做反應溶液，我們可觀察到，當 pH 9.0 時，此 43 kDa 蛋白酵素具最大之活性。（圖四）

五、正常老鼠之脾、肺、肝及腎等四個器官之組織研磨液做 zymography 分析，可觀察到各不同組織中所含蛋白酵素之種類及量都有差異。

（圖五、六）

## 討 論

一、

在這個報告中，我們描述了存在於 S-180 細胞質液中 43 kDa 的蛋白酵素，其在 pH 9.0 時有最大活性，因 EDTA 對其活性沒有影響，故推測此 43 kDa 蛋白酵素不屬於 metalloproteinases 類，與 collagenases 完全不一樣，因 collagenases 會被 EDTA 抑制而失去分解蛋白的活性。但其會受到 ACTI、ALTI、DLTI 等由植物抽取得到的蛋白抑制劑的抑制，ALTI、ACTI 等植物蛋白抑制劑是 Kunitz 型蛋白酵素抑制劑，會抑制 trypsin 和部份抑制 chymotrypsin，故此 43 kDa 蛋白酵素應歸類於 serine protease inhibitor；然而對 serine protease 有專一性抑制作用之 PMSF、TPCK 和 TLCK 對此 43 kDa 蛋白酵素卻無抑制作用。

關於這個蛋白，我們發現了一有趣的性質就是：S-180 細胞質液未以 trypsin 處理和以 trypsin 處理的蛋白酵素表現是不同的。在 gelatin zymogram 上，未經 trypsin 處理，43 kDa 處沒有蛋白酵素的活性產生；相對的，細胞質液以 trypsin 處理，則在 43 kDa 處有蛋白酵素的活性存在。這個結果指出：這個酵素是以前驅物的形態被合成出來，其須要細胞內如 trypsin 類之酵素將其轉變為活化型之蛋白酵素。如同 Saksela 和 Dano 所指出 plasminogen activators 是以 proenzyme 型態被生成<sup>(18)</sup>。

我們也發現另一個蛋白酵素的的存在，其分子量約 65 kDa，因其會受到 EDTA 的抑制，所以是 metalloproteinases，其不需 trypsin 之活化即具。

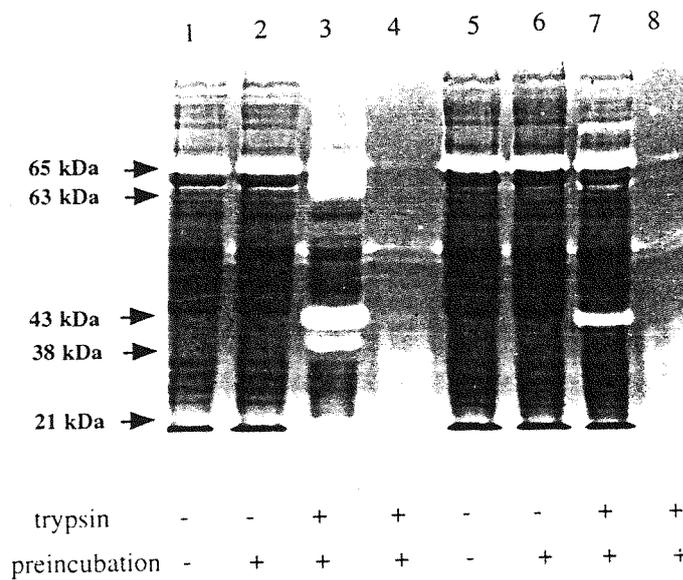
本篇研究中，我們也觀察了老鼠之不同器官細胞質液蛋白酵素活

性之異同，不同的器官所含蛋白酵素在種類及量方面皆不相同。

在以不同的酵素活化之實驗中，nargase 和 thermolysin 之作用無法分析。可探討的是 chymotrypsin 活化的結果，其型式與 trypsin 所活化者不同，43 kDa 的蛋白酵素並未出現，但同樣有 63 kDa 之蛋白酵素產生。此兩個 63 kDa 蛋白酵素是否相同？是否由同一蛋白酶前趨物而來？有可能 trypsin 之製備常有 chymotrypsin 之污染，故於 trypsin 處理時 63 kDa 蛋白酵素被 chymotrypsin 活化。

由於 S-180 細胞可利用老鼠之腹腔來培養，細胞之取得較易取得，故我們可純化分析此蛋白酵素，與人類癌細胞之蛋白酵素做比較，假若有高的相似性，我們可以利用此類蛋白酵素做抑制癌細胞轉移物質之篩選。

## 圖表說明



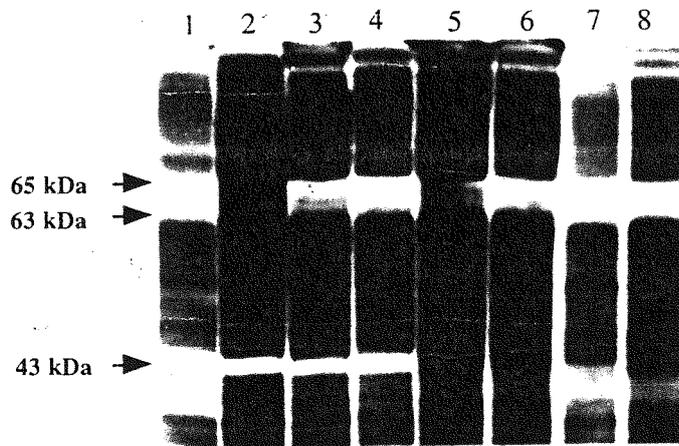
圖一：S-180 細胞質液內含蛋白酶之活性

S-180 細胞質液處理或不處理 trypsin，而後做 zymography 分析。

Lane 1-3 取蛋白量 50 ug 與 0.1 ug trypsin 反應。

Lane 5-7 取蛋白量 50 ug 與 0.05 ug trypsin 反應。

Lane 1,2,5,6 未加 trypsin 之細胞質液；Lane 4 與為 0.05 ug trypsin，  
做為對照。

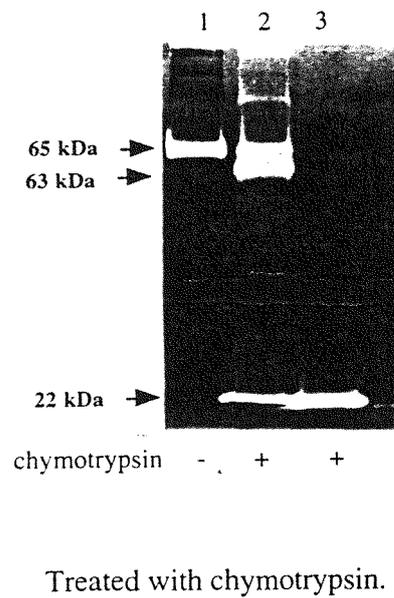


Effect of inhibitors on proteolytic activity.

圖二：抑制劑對蛋白酵素活性的影響。

細胞質液以 trypsin 活化後，做 zymography 分析。

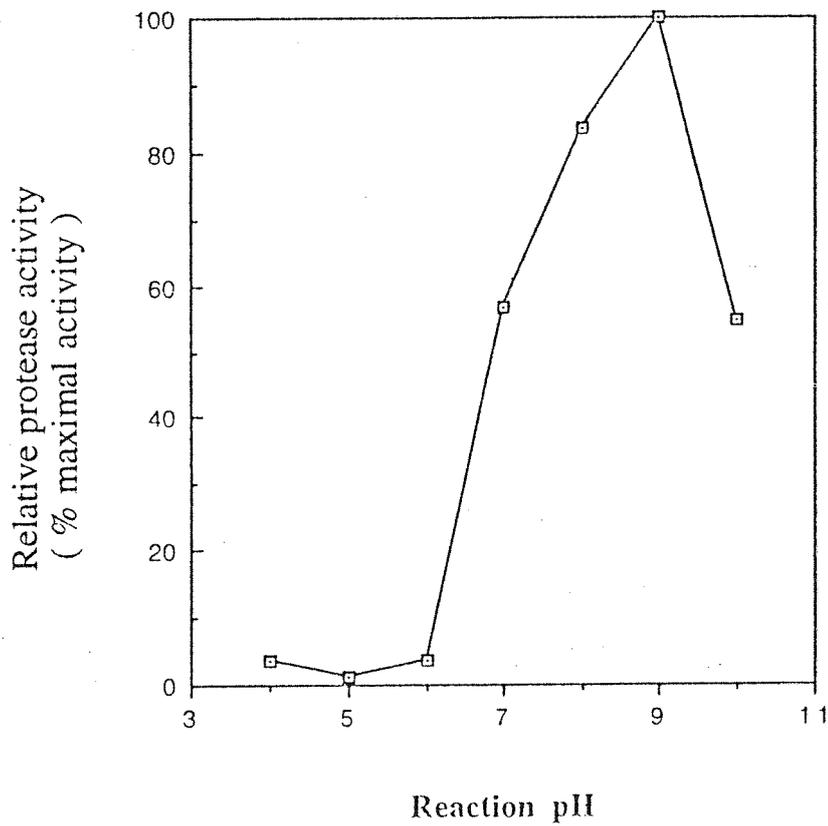
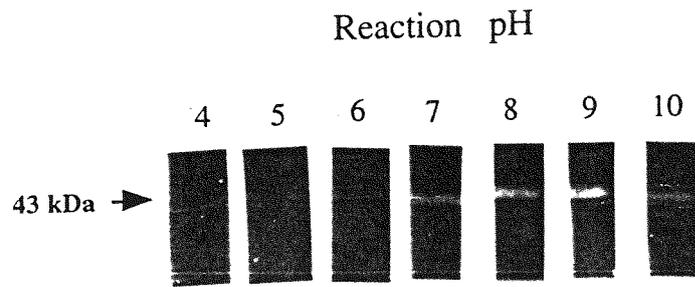
Lane 1: 單純 reaction buffer ; Lane 2: reaction buffer 含 20 mM EDTA ; Lane 3: reaction buffer 含 1mM PMSF ; Lane 4: reaction buffer 含 1 mM TPCK ; Lane 5: reaction buffer 含 10 ug/ml ACTI ; Lane 6: reaction buffer 含 10 ug/ml ALTI ; Lane 7: reaction buffer 含 10 ug/ml TI from rice.



圖三：S-180 細胞質液以 chymotrypsin 處理。

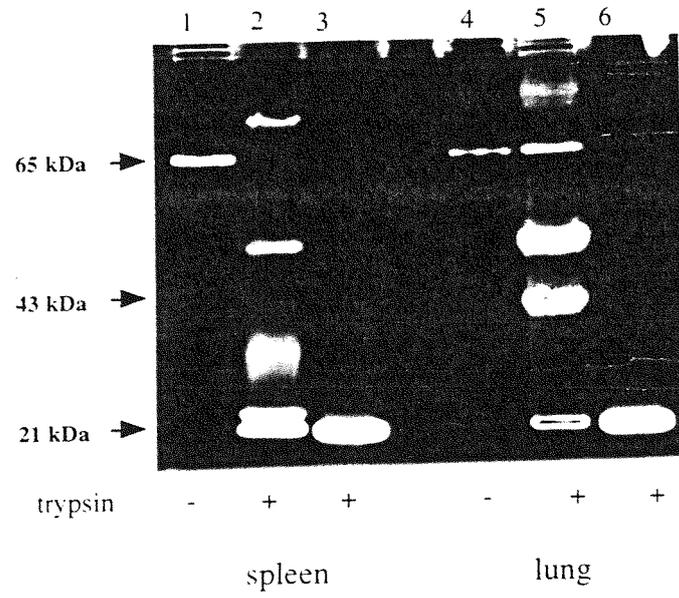
S-180 細胞質液處理或不處理 chymotrypsin，而後做 zymography 分析。

Lane 1：未加 chymotrypsin 之細胞質液； Lane 2：取蛋白量 50 ug 與 0.05 ug chymotrypsin 反應； Lane 3：只含 0.05 ug chymotrypsin，做為對照。

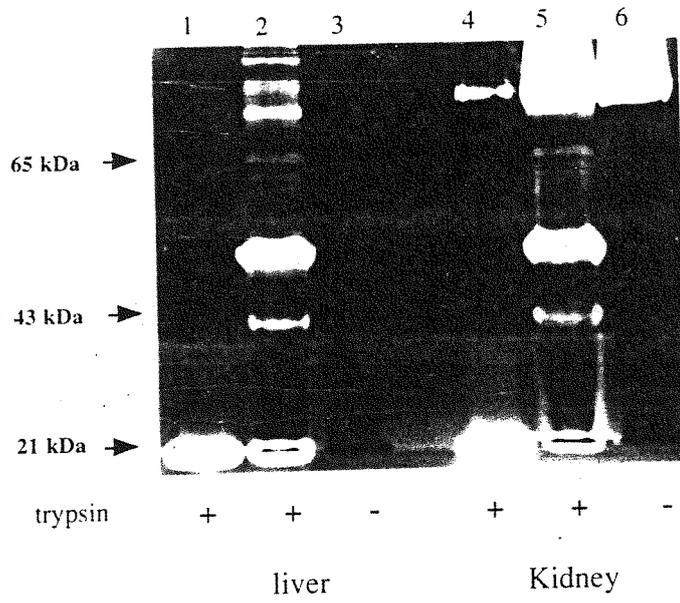


圖四：pH 值對 43 kDa 蛋白酵素活性之影響。

細胞質液以 trypsin 活化後，做 zymography 分析。但 incubation 時，  
reaction buffer 為 pH 4.0 - 10.0 。



圖五：正常老鼠脾臟和肺臟組織所含蛋白酶之活性。



圖六：正常老鼠肝臟和腎臟組織所含蛋白酶之活性。

## 參 考 文 獻

1. Baker, M. S., Bleakley, P., Woodrow, G. C. and DOE, W. F. Inhibition of cancer cell urokinase plasminogen activator by its specific inhibitor PAI-2 and subsequent effects on extracellular matrix degradation. *Cancer Res.* 50 : 4676-4684, 1990.
2. Barret, A. J. The cystatins: a new class of peptidase inhibitors. *Trends Biochem. Sci.* 12 : 193-196, 1987.
3. Basset, P., Bellocq, J. P., Wolf, C., Stoll, I., Hutin, P., Limacher, J. M., Podhajcer, O. L., Chenard, M. P., and Chambon, P. A novel metalloproteinase gene specially expressed in stroma cells of breast carcinomas. *Nature* 348 : 699-704, 1990.
4. Bernhard, E. J., Muschel, R. J., and Hughes, E. N. Mr 92000 gelatinase correlates with the metastatic phenotype in transformed rat embryo cells. *Cancer Res.* 50 : 3872-3877, 1990.
5. Billings, P. C., Habres, J. M., and Kennedy, A. R. Inhibition of radiation-induced transformation of C3H/10T1/2 cells by specific protease substrates. *Carcinogenesis* 11 : 329-332, 1990.
6. Billings, P. C., Habres J. M, Liao, D. C. and Tuttle, S. W. Human fibroblast contain a proteolytic activity which is inhibited by the Bowman-Birk protease inhibitor. *Cancer Res.* 51 : 5539-5543, 1991.
7. Billings, P. C., and Habres, J. M. A growth-regulated protease activity that is inhibited by the anticarcinogenic Bowman-Birk protease inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89 : 3120-3124, 1992.
8. Bogenmann, E., and Jones, P. A. Role of plasminogen in matrix breakdown by neoplastic cells. *J. Natl. Cancer Inst.* 71 : 1177-1182, 1983.
9. Brown, P. D., Bloxidge, R. E., Stuart, N. S., Gatter, K. C., James Carmichael. Association between expression of activated 72-kilodalton gelatinase and tumor spread in non-small-cell lung carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* 85 : 574-578, 1993.
10. Burgeson, R. E. New collagens, new concepts. *Annu. Rev. Cell Biol.* 4 : 6184-6191, 1990.

11. Cajot, J. F., Bamat, J., Bergonzelli, G. E., Kruithof, E. K. O., Medcalf, R. L., Testuz, J. and Sordat, B. Plasminogen-activator inhibitor type 1 is a potent natural inhibitor of extracellular matrix degradation by fibrosarcoma and colon carcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 : 6939-6943, 1990.
12. Costantini, V., and Zacharski, L. R. Fibrin and cancer. *Throm. & Haem.* 69 : 406-414, 1993.
13. Capony, F., Rougeot, C., Montcourrier, P., Cavailles, V., Salazar, G., and Rochefort, H. Increased secretion, altered processing, and glycosylation of pro-cathepsin D in human mammary cancer cells. *Cancer Res.* 49 : 3904-3909, 1989.
14. Chapman, H. A. and Stone, O. . Cooperation between plasmin and elastase in elastin degradation by intact murine macrophages. *Biochem. J.* 222 : 721-728, 1984.
15. Chen, J. M. and Chen, W. T., Fibronectin-degrading proteases from the membranes of transformed cells. *Cell* 48 : 193-203, 1987.
16. Crowley, C. W., Cohen, R. L., Lucas, B. K., Liu, G., Shuman, M. A. and Levinson, A. D. Prevention of metastasis by inhibition of the urokinase receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90 : 5021-5025, 1993.
17. Scher, W. *Biology of disease. The role of extracellular proteases in cell proliferation and differentiation.* *Lab. Invest.* 57 : 607-633, 1987.
18. Dano, K., Andreasen, P. A., Grondahl-Hansen, J., Kristensen, P. I., Nielsen, L. S. and Skriver, L. Plasminogen activators, tissue degradation, and cancer. *Adv. Cancer res.* 44 : 139-266, 1985.
19. Declerck, Y. A., Yean, T. D., Chan, H., Langley, K. E. Inhibition of tumor invasion of smooth muscle cell layers by recombinant human metalloproteinase inhibitor. *Cancer Res.* 51 : 2151-2157, 1991.
20. Dawson, R. M. C., Elliott, D. C., Elliott, W. H., and Jones, K. M. pH, buffers, and physiological media. *Data for biochemical research* 20 : 481-498, 1968.
21. Eckhout, Y., and Vaes, G. Further studies on the activation of procollagenase, the latent precursor of bone collagenase: effect of lysosomal cathepsin B, plasmin,

- and kallikrein, and spontaneous activation. *Biochem. J.* 166 : 21-31,1977.
22. Goldberg, G. I., Marmer, B. I., Grant, G. A., Eisen, A. Z., Wilhelm, S. and He, C. Human 72-kilodalton type IV collagenase forms a complex with a tissue inhibitor of metalloproteinases designated TIMP-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 : 8207-8211, 1989.
23. Grant, G. A., Eisen, A. Z., Marmere, B. L., Roswit, W. T. and Goldberg, G. I. The activation of human skin fibroblast procollagenase. *J. Biol. Chem.* 262 : 5886-5889, 1987.
24. Growley, C. W., Cohen, R. L., Lucas, B. K., Liu, G., Shuman, M.A., and Levinson, A. D. Prevention of metastasis by inhibition of the urokinase receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 : 5021-5025, 1993.
25. He, C., Wilhelm, M. W., Pentland, A. P., Marmer, B. L., Grant, G. A., Eisen, A. Z. and Goldberg, G. I. Tissue cooperation in proteolytic cascade activating human interstitial collagenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 : 2632-2636, 1989.
26. Hiroshi, K., Hidekazu, O., Motoi, S., Hiromitsu, S., Toshiro, F., and Toshihiro, T. Inhibition of in vitro Ovarion cancer cell invasion by modulation of urokinase-type plasminogen activator and cathpsin B. *Cavcer Res.* 52 : 3610-3614, 1992.
27. Herron, G. S., Banda, M. J., Clark, E. J., Gavrilovic, J. and Werb, Z. Secretion of metalloproteinases by stimulated capillary endothelial cells. II. Expression of collagenase and stromelysin activities is regulated by endogenous inhibitors. *J. Biol. Chem.* 261 : 2814-2818, 1986.
28. Hollas, W., Blasi, W. F. and Boyd, D. Role of the urokinase receptor in facilitating extracellular matrix invasion by cultured colon cancer. *Cancer Res.* 51 : 3690-3695, 1991.
29. Hook, V. K. H., Azaryan, A. V., Hwang, S. R., and Tezapsidis, N. Proteases and the emerging role of protease inhibitors in prohormone processing. *FASEB* 8 : 1269-1278, 1994.
30. Jessup, J. M. Cathepsin B and other proteases in human colorectal carcinoma. *Amer. J. Pathol.* 145 : 253-262, 1994.

31. Jones, P. A., and Declerck, Y.A., Destruction of extracellular matrices containing glycoproteins, elastin and collagen by metastatic human tumor cells. *Cancer Res.* 40 : 3222-3227, 1980.
32. Kobayashi, H., Schmitt, M., Goretzki, L., Chucholowski, N., Calvete, J., Kramer, M., Gunzler, W. A., Janicke, F., and Graeff, H. Cathepsin B efficiently activates the soluble and the tumor cell receptor-bound form of the proenzyme urokinase-type plasminogen activator. *J. Biol. Chem.* 266 : 5147-5152, 1991.
33. Kennedy, A.R., Prevention of carcinogenesis by protease inhibitors, *Cancer Res.* 54 : 1999s-2005s, 1994.
34. Kleiner, D. E. Jr., Tuuttila, A., Tryggvason, K., and Stetler-Stevenson, W. G. Stability analysis of latent and active 72-kDa type IV collagenase: The role of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2). *Biochemistry* 32 : 1583-1592, 1993.
35. Kobayashi, H., Gotoh, J., Hirashima, Y., Fujie, M. Suginol, D. and Terao, T., Inhibitory effect of a conjugate between human urokinase and urinary trypsin inhibitor on tumor cell invasion in vitro. *J. Biol. Chem.* 270 : 8361-8366, 1995.
36. Billings, P.C., J.T., Ohnishi, N., Liao, D.C., and Habres, J.M. The interaction of the potato-derived chymotrypsin inhibitor with C3H/10T1/2 cells. *Carcinogenesis* 12 : 653-657, 1991.
37. Liotta, L. A., Steeg, P. S. and Stetler-Stevenson, W. G. Cancer metastasis and angiogenesis: An imbalance of positive and negative regulation. *Cell* 64 : 327-336, 1991.
38. Liotta, L. A., Rao, C. N., and Barsky, S. H. Tumor invasion and the extracellular matrix. *Lab. invest.*, 49 : 636-649, 1983.
39. Lyons, J. G., Hansen, B. B., Moore, W. G., O'Grady, R. L. and Birkedal, B. H. Characteristics of a 95-kDa matrix metalloproteinase produced by mammary carcinoma cells. *Biochemistry* 30 : 1449-1456, 1991.
40. Moin, K., Day, N. A., Sameni, M., Hasnain, S., Hiramata, T., and Sloane, B. F. Human tumor cathepsin B comparison with normal liver cathepsin B. *Biochem. J.* 285 : 427-434, 1992.

41. Moy, L.Y. and Billings, P. C. A proteolytic activity in a human breast cancer cell line which is inhibited by the anticarcinogenic Bowman-Birk protease inhibitor. *Cancer letter* 85 : 205-210, 1994 .
42. Moscatelli, D., and Rifkin, D. B. Membrane and matrix localization of proteinase: a common theme in tumor cell invasion and angiogenesis. *Biochim. Biophys. Acta.* 948 : 67-85,1988.
43. Mignatti, P., and Barlati, S. Enhancement of plasminogen activator activity by the culture medium of Rous sarcoma virus transformed cells. *J.Gen. Virol.* 63 : 365-373,1982.
44. Moll, U. M., Lane, B., Zucker, S., Suzuki, K., and Nagase, H. Localization of collagenase at the basal plasma membrane of a human pancreatic carcinoma cell line . *Cancer Res.* 50 : 6995-7002, 1990.
45. Mackay, A. R., Hartzler, J. L., Pelina, M. D., and Thorgeirsson, U. P. Studies on the ability of 65-kDa and 92-kDa tumor cell gelatinases to degrade type IV collagen. *J. Biol. Chem.* 265 : 21929-21934,1990.
46. Michaud, D., Faye, L., and Yelles, S. Electrophoretic analysis of plant cysteine and serine proteinases using gelatin-containing polyacrylamide gels and class-specific proteinase inhibitors. *Electrophoresis* 14 : 94-98, 1993.
47. Miller, E. J., Harris, E. D., Chung, E., Finch, F. E., McCroskery, P. A., and Butler, W. T. Cleavage of type II and III collagens with mammalian collagenase: site of cleavage and primary structure of the NH<sub>2</sub>-terminal portion of the smaller fragment released from both collagens. *Biochemistry* 15 : 787-792, 1976.
48. Mullins, D. E. and Rohrllich, S. T. , The role of proteinases in cellular invasiveness. *Biochi. Biophys. Acta* 695 : 177-214, 1983.
49. Medl, M., Ogris, E., Peter-Engl, C., and Leodolter, S. TATI(tumor-associated trypsin inhibitor) as a marker of ovarian cancer . *Brit. J. cancer*, 71 : 1051-1054, 1995.
50. Mills, P. K., Lawrence P. W., Abbey, D. E., Fraser, G. E., and Phillips, R. L. Dietary habits and past medical history as related to fatal pancreas cancer risk among adventists. *Cancer* 61 : 2578-2585, 1988.

51. Nakajima, M., Welch, D. R., Belloni, P. N. and Nicolson, G. L. Degradation of basement membrane type IV collagenase and lung subendothelial matrix by rat mammary adenocarcinoma cell clones of differing metastatic potentials. *Cancer Res.* 47 : 4869-4876, 1987.
52. Kaoshikawa, N. Yasumitsu, H. Umeda, M., and Miyazaki, K. Multiple secretion of matrix serine proteinases by human gastric carcinoma cell lines. *Cancer Res.* 52 : 5046-5053, 1992.
53. Paola, D. P., Norma, R., and Kevin, C. J. Expression of gelatinolytic activity by oesophageal and colon carcinoma cell lines. *Biochem. Soci. Trans.* 23 : 391s, 1995.
54. Pasanen, P. A., Eskelinen, M., Partanen, K., Pikkarainen, P., Penttila, I., and Alhava, E. Tumor-associated trypsin inhibitor in the diagnosis of pancreatic carcinoma. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 120 : 494-497, 1994.
55. Reich, R., Thompson, E. W., George, Y. I., Martin, G. R., Deason, J. R., Fuller, G. C., and Miskin, R. Effect of inhibitors of plasminogen activator, serine proteinases, and collagenase IV on the invasion of basement membranes by metastatic cells. *Cancer Res.* 48 : 3307-3312, 1988.
56. Redwood, S. M., Liu, C. S., Weiss, R. E., Hodge, D. E. and Droller, M. J. Abrogation of the invasion of human bladder tumor cells by using protease inhibitors. *Cancer* 69 : 1212-1219, 1992.
57. Rozhin, J., Robinson, D., Stevens, M. A., Lah, T. T., Honn, K.V., Ryan, R. E., and Sloane, B. F. Properties of a plasma membrane-associated cathpsin B-like cystein proteinase in metastatic B16 melanoma. *Cancer res.* 47 : 6620-6628, 1987.
58. Steller-Stevenson, W. G., Type IV collagenases in tumor invasion and metastasis. *Cancer metast. rev.* 9 : 289-303, 1990.
59. Sato, H., Takino, T. Okada, Y., Cao, J., Shinagawa, A., Yamamoto, E., and Seiki, M. A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumor cells. *Nature* 370 : 61-65, 1994.
60. Fini, M. E., Yue, B.Y., and Sugar, J. Collagenolytic/gelatinolytic metalloproteinases in normal and keratoconus corneas. *Curr. Eye Res.* 11 : 849-862,

1992.

61. Suzuki, K, Enghild, J. J., Morodomi, T., Salvesen, G. and Nagase, H.  
Mechanisms of activation of tissue procollagenase by matrix metalloproteinase3  
(stomelysin) , *Biochemistry*, 29 : 10261-10270, 1990.
62. Shehan, K., Shuja, S. and Murnane, M. J. , Cysteine prortease activities and  
tumor development in human colorectal carcinoma. *Cancer Res.* 49 : 3809-  
3814, 1989.
63. Tryggvason, K., Hoyhtya, M., and Pyke, C. Type IV collagenases in invasive  
tumors. *Breast Cancer Res. & Treat.* 24 : 209-218, 1993.
64. Shapiro, S.D., Kobayashi, D.K. and Welgus, H.G. Identificatio of TIMP-2 in  
human alveolar macrophages. Regulation of biosynthesis is opposite to that of  
metalliproteinases and TIMP-1. *J. Biol. Chem.* 267 : 13890-13894, 1992.
65. Wojtukiewicz, M. Z., Zacharski, L. R., Memoli, V. A., Kisiel, W., Kudryk, B. J.,  
Rousseau, S. M. and Stump, D. C. Abnormal regulation of coagulation/  
fibrinolysis in small cell carcinoma of the lung. *Cancer* 65 : 481-485, 1990.
66. Woessner, J. F. Jr. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective  
tissue remodeling. *FASEB* 5 : 2145-2154, 1991.
67. Yagel, S., Warner, A. H., Nellans, H. N., Lala, P. K., Waghorne, C., and  
Denhardt, D. T. Suppression by cathpsin L inhibitors of the invasion of amnion  
membranes by murine cancer cells. *Cancer res.*, 49 : 3553-3557, 1989.
68. Yavelow, J., Collins, M., Birk, Y., Troll, W., and Kennedy, A. R. Nanomolar  
concentrations of Bowman-Birk soybean protease inhibitor supress X-ray-  
induced transformation in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82 : 5395-5399,  
1985.
69. Yavelow, J., Finlay, T. H., Kennedy, A. R., and Troll, W. Bowman-Birk  
soybean protease as an anticarcinogen. *Cancer Res.* 43 : 2454-2459, 1983.
70. Zucker, S., Wieman, J. M., Lysik, R. M., Wilkie, D., Ramamurthy, N. S., Gloub,  
L. M., and Lane, B. Enrichment of collagen and gelatin degrading activities in  
the plasma membranes of human cancer cells. *Cancer Res.* 47 : 1608-1614,  
1987 .

71. Cubellis, M. V., Wun, T. C., and Blasi, F. Receptor mediated internalization and degradation of urokinase is causative of its specific inhibitor PAI-1. *EMBO J.* 9 : 1079-1085, 1990 .
72. Breiman, L., Friedman, J. H., Olsen, R. A. and Stone, C. J. Classification and regression trees. Wadworth, Belmont, 1984.
73. Segal, M. R., and Bloch, D. A. A comparison of estimated proportional hazards models and regression trees. *Stat. Med.* 8 : 539-550, 1990.
74. Ravdin, M. P. Evaluation of cathepsin D as a prognostic factor in breast cancer. *Breast Cancer Res. & Treat.* 24 : 219-226, 1993.
75. Stromatt S. C. Secretory leukocyte protease inhibitor in cystic fibrosis. *Agents & Actions* 42(s) : 103-110, 1993.
76. Vincenti, M. P. Clark, I. M., and Brinckerhoff, C. E. Using inhibitors of metalloproteinases to treat arthritis. Easier said than done ? *Arthritis & Rheumatism* 37 : 1115-1126, 1994.
77. Goldberg, G.I., Wilhelm, S.M., Kronberger, A., Bauer, E. A. Grant, G. A., and Eisen, A. Z. Human fibroblast collagenase : Complete primary structure and homology to an oncogene transformation-induced rat protein. *J. Biol. Chem* 261 : 6600-6605, 1986.
78. Hibbs, M. S., Hasty, K. A., Seyer, J. M. Kang, A. H., and Mainardi, C. L. Biochemical and immunological characterization of the secreted forms of human neutrophil gelatinase. *J. Biol. Chem.* 260 : 2493-2500.
79. Whitham, S. E., Murphy, G. Angel, P., Rahmadorf, H. J., Smith, B. J., Lyons, A., Harris, T., Reynolds, J. J., Herrlich, P., and Docherty, A. J. P. Comparison of human stromelysin and collagenase by cloning and sequence analysis. *Biochem. J.* 240 : 913-916, 1987.
80. Levy, A.T., Cioce, V., Sobel, M. E., Garbisa, S., Grigioni, W. F., Liotta, L. A., and Stetler-Stevenson, W. G. Increased expression of the Mr 72000 type IV collagenase in human colonic adenocarcinoma. *Cancer Res.* 51 : 439-444, 1991.
81. Eaton, D. L., Scott, R. W., and Baker, J. B. Purification of human fibroblast

- urokinase proenzyme proenzyme and analysis of its regulation by proteases and protease nexin. *J. Biol. Chem.* 259 : 6241-6247, 1984.
82. Wilhelm, S. M., Collier, I. E., Kronberger, A., Eisen, A. Z., Marber, B. L., Grant, G. A., Bauer, E. A. and Goldberg, G. I. Human skin fibroblast stromelysin : structure, glycosylation, substrate specificity, and differential expression in normal and tumorigenic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 : 6725-6729, 1987.
83. Wilhelm, S. M., Collier, I. E., Marmè, B. L., Eisen, A. Z., Grant, G. A., and Goldberg, G. I. SV40-transformed human lung fibroblasts secrete a 92-kDa type IV is identical to that secreted by normal human macrophages. *J. Biol. Chem.* 264 : 17213-17221, 1989.
84. Woessner, J. F., Jr., and Taplin, C. J. Purification and properties of a small latent matrix metalloproteinase of rat uterus. *J. Biol. Chem.* 263 : 16918-16925, 1988.
85. Parish, D. C., Tuteja, R., Altstein, M., Gainer, H., and Loh, Y.P. Purification and characterization of a rapid basic residue-specific prohormone-converting enzyme from bovine pituitary neural lobe secretory vesicles. *J. Biol. Chem.* 261 : 14392-14397, 1986.
86. Krieger, T. j., Mende-Muller, L., and Hook, V. Y. H. Prohormone thiol protease and enkephalin precursor processing : cleavage at dibasic and monobasic sites. *J. Neurochem.* 59 : 26-31, 1992.
87. Azaryan, A. V., and Hook, V. H. H. Unique cleavage specificity of 'prohormone thiol protease' related to proenkephalin processing. *FEBS Lett.* 341 : 197-202, 1994.
88. Gomez, S., Gluschkof, P., Lepage, A., and Cohen, P. Relationship between endo- and exopeptidase in a processing enzyme system : activation of an endoprotease by the aminopeptidase B-like activity in somatostatin-28 convertase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 : 5468-5472, 1988.
89. Bourdais, J., Perotti, A. r., Boussetta, H., Barre, N., Devilliers, G., and Cohn, P. Isolation and functional properties of an arginine-selective endoprotease from rat intestinal mucosa, a putative prosomatostatin convertase. *J. Biol. Chem.* 266 :

- 23386-23391, 1991.
90. Wypij, D. M., and Harris, R. B. Atrial granules contain an amino-terminal processing enzyme of atrial natriuretic factor. *J. Biol. Chem.* 263 : 7079-7086, 1988.
  91. Shen, F. S., Robert, S. F., and Linberg, I. A putative processing enzyme for proenkephalin in bovine adrenal chromaffin granule membranes. *J. Biol. Chem.* 264 : 15600-15605, 1989.
  92. McDonald, J. Extracellular matrix assembly. *Annu. Rev. Cell Biol.* 4 : 183-207, 1988.
  93. Fischer, A. Tissue culture. Studies in experimental morphology and general physiology of tissue cells in vitro. Copenhagen: Levin & Munksgaard, 1925.
  94. Golberg, A. R., Increased protease level in transformed cells : a casein overlay for the detection of plasminogen activator production. *Cell* 2 : 95-102, 1974.
  95. Ossowski, L., Quigley, J. C., Kellerman, G. M., and Reich, E. Fibrinolysis associated with oncogenic transformation. *J. Exp. Med.* 138 : 1056-1064, 1973.
  96. Lu, X., Levy, M., Weinstein, B., and Santella, T. M. Immunological quantitation of levels of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in human colon cancer. *Cancer Res.* 51 : 6231-6235, 1991.
  97. Stetler-Stevenson W. G., Brown, P. D., Onisto, M., Levy, A. T., and Liotta, L. A. Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) mRNA expression in tumor cell lines and human tumor tissues. *J. Biol. Chem.* 265 : 13933-13938, 1990.
  98. Alexander, C. M., and Werb, Z. Targeted disruption of the tissue inhibitor of metalloproteinase gene increases the invasive behavior of primitive mesenchymal cells derived from embryonic stem cells in vitro. *J. Cell Biol.* 118 : 727-739, 1992.
  99. Carrel, R., and Travis, J. Alpha-1-antitrypsin and the serpins : variation and countervariation. *Trends Biochem. Sci.* 10 : 20-25, 1985.