

中文摘要

近年來，數種治療乳癌的西藥被報導會引起許多副作用，所以中草藥及食材成為當前抗癌熱門話題。一些研究報告指出，攝取較多大豆製品的人，其罹患乳癌、攝護腺癌的機率較低。故本研究的目標為評估食材中黑豆及合成的胜? 類緣物對人類雌激素依賴型乳癌細胞 (MCF-7) 的影響。以序列濃度的台南五號黑豆水提取物 (0、0.15、0.31、0.62、1.25 及 2.50 mg/mL) 處理 MCF-7 細胞 12、24、48 及 72 小時後，評估台南五號黑豆水提取物於不同濃度、不同處理時間對 MCF-7 細胞細胞存活百分率及細胞週期分佈之影響。黑豆實驗中，濃度 2.50 mg/mL 的台南五號黑豆水提取物處理 MCF-7 細胞 12~72 小時後，細胞存活百分率相對於控制組分別為 47%、26%、10%、6%，故隨著台南五號黑豆水提取物處理時間的增加，MCF-7 細胞存活百分率逐漸降低。以 0.15~2.50 mg/mL 台南五號黑豆水提取物處理 MCF-7 細胞 72 小時後，細胞存活百分率相對於控制組平均分別為 81%、65%、39%、18%、6%，有劑量依存關係。細胞週期分佈之影響方面，以台南五號黑豆水提取物 0~2.50 mg/mL 處理 24 小時，會促使細胞從 G0~G1 期移到 S 期，但 S 期並不繼續走向 G2~M 期而停滯於 S 期。2.50 mg/mL 台南五號黑豆水提取物處理 MCF-7 細胞 48 小時，凋亡細胞佔細胞週期比率的 7%。經台南五號黑豆水提取物 72 小時的處理，隨濃度的增加，細胞凋亡 (apoptosis) 的現象也有顯著增加；而以 2.50 mg/mL 台南五號黑豆水提取物處理 72 小時，細胞幾乎沒有存活。胜? 實驗中，合成的胜? 類緣物 peptide 3 (Fmoc-Glu-Tyr-Aib-Asn-NH₂) 係利用 BIAcore 儀器之表面薄膜共振技術評估，發現能干擾 Grb2 SH2 區塊之交互作用的胜? 先導物，並研究其對乳癌細胞之影響；以 12.5 μM 的 peptide 3

處理 24 小時後，S 期之細胞分佈即明顯下降；以 50.0 及 62.5 μM 的 peptide 3 處理 24 小時後，apoptosis 的細胞分別增加 8% 及 17%，表示 apoptosis 隨著濃度增加而上升。故天然食材黑豆與小分子胜? (Fmoc-Glu-Tyr-Aib-Asn-NH₂) 具有抗 MCF-7 乳癌之效果。

關鍵字：黑豆 (black soybean)、人類雌激素依賴型乳癌細胞 (human estrogen-dependent breast cancer cell line, ER+ MCF7)、胜? (peptides)、流式細胞儀 (flow cytometry)、細胞凋亡 (apoptosis)

Abstract

In recent years, several kinds of western medicines for the breast cancer therapy were reported to have many side effects. Therefore, the herbal medicine and food become popular topics in studies related to the development of anticancer agents. Some studies indicated that those who intake more soybean products have the lower morbidity of breast cancer and prostate cancer. The objective of this study is to evaluate effects of the black soybean and the synthetic peptide on breast cancer cells. Water extract of Tainan No.5 black soybean (black soybean milk, T5) was freeze-dried. ER+ MCF7 cells were treated with various concentrations of T5 (0, 0.15, 0.31, 0.62, 1.25, 2.50 mg/mL) for various times and then analyzed for their effects on cell viability and cell cycle distribution by flow cytometry. Following treatment with 2.50 mg/mL T5 for 12, 24, 48, and 72 hrs, cell viability decreased to 47%, 26%, 10%, 6%, respectively, compared with control group (100%). S-phase arrest was found in ER+ MCF7 cells treated with 2.5 mg/mL T5 for 24 hrs. The proportions of apoptotic cells were significantly increased in ER+ MCF7 cells treated with 2.5 mg/mL T5 for 48 and 72hrs. These results suggest that effects of T5 on ER+ MCF7 breast cancer cells were related to its inhibition on the cell cycle progression. The inhibitory effects of synthetic peptides on the Grb2 SH2 interaction were evaluated by SPR, and Fmoc-Glu-Tyr-Aib-Asn-NH₂ (peptide **3**) was found to be the lead compound with the highest inhibitory effect. For further evaluate its effect on breast cancer cells, ER+ MCF7 cells were treated

with various concentrations of the peptide **3** (0, 12.5, 25.0, 37.5, 50.0, 62.5 μM) for various times and then analyzed for their effects on cell viability and cell cycle distribution by flow cytometry. S-phase down-regulated was found in ER+ MCF7 cells treated with 12.5 μM of peptide **3** for 24 hrs. The proportions of apoptotic cells were significantly increased to 8% and 17% in ER+ MCF7 cells treated with 50.0 μM and 62.5 μM of peptide **3** for 24 hrs. Results of this study indicate that black soybean and the small molecular weight peptide, Fmoc-Glu-Tyr-Aib-Asn-NH₂, have biological effects on breast cancer cells.

第一章 前言

自民國七十一(西元 1982 年)年起，癌症即成為臺灣地區十大死因之首。根據行政院衛生署九十一年度的統計數字顯示，女性罹患惡性腫瘤死亡人數為 12322 人，平均每天有 34 人因癌症過世，前五名分別為肺癌、肝癌、結腸直腸癌、乳癌及子宮頸癌。更令人憂心的是，自民國八十八年起至最新衛生署統計資料顯示乳癌已成為婦癌(乳癌、子宮頸癌、卵巢癌)死因的第一位，且有向上攀升、日漸年輕化的趨勢。在西藥治療方面，西元 1997 年發現，原本用來治療乳癌藥 Tamoxifen 可能導致子宮頸癌【1】。西元 2000 年，經過 FDA 核准上市的轉移性乳癌的治療新藥 Herceptin，生產該藥的 Genetech 公司也發出警告，說明有十五起婦女服用此藥後死亡的事件【2】。

因為西藥引起副作用的報告不斷，研究人員漸漸把注意力轉移到中草藥。例如 - 苦艾 (Wormwood)，華盛頓大學的生物工程研究員 Henry Lai 的報告顯示，全草含苦艾素 (absinthin)、安苦艾素 (anabsinthin)、艾黃素 (artemisetin)、詳艾內酯 (artabsin) 等，還含揮發油，成分有側柏醇、側柏酮、蒎烯等，此複合物可以在十六個小時內消滅了試管內所有與其接觸的人體癌細胞【3】。此外，西元 1994 年，FDA 通過的紫杉醇用於轉移性乳癌的第二線化學治療或在輔助性化學治療完後六個月內復發的乳癌患者也非常有效【4】。近年來，有許多學者研究指出，黑豆 (*Glycine max* [L.] Merrill) 富含抗氧化物質，包括異黃酮類 (Isoflavone)、皂素 (Saponin)、花青素 (Anthocyanin)、維生素 E 等，其中異黃酮類之 Genistein 具有抗癌效果。異黃酮主要分布於大豆中，由於異黃酮素特殊的化學結構使其具有雌激素、抗黴菌及抗氧化的特性。一些研究報告指出，攝取較多大豆製品的人，如日本人其罹患乳癌、攝

護腺癌的機率較歐美人為低。而美國人與英國人罹患乳癌、大腸癌和攝護腺癌的機率比中國人與日本人高出四倍。

因為大豆在日常生活中易取得，故本研究以台南五號黑豆為其中一個實驗目標，試驗其對乳癌細胞是否有影響，並利用 Daidzein、Genistein、Formononetin、Biochanin 及 6-methoxyflavanone 五種異黃酮建立了異黃酮標準曲線，求得台南五號黑豆中異黃酮種類及含量。

目前小分子藥物中尤以胜? 藥物為應積極開發的目標。胜? 的製藥潛力在於胜? 為身體內最自然的傳輸機制，並能打破生物屏障 (Breaking the Biobarrier)，經由設計賦予胜? 藥物的功能，使其順利穿透腸胃道的細胞膜或血腦障壁 (Blood-Brain Barrier ; BBB)，進入血液循環，發揮治病的功效，例如帕金森氏症、癲癇症或其他中樞神經系統疾病應用此原理，找到治癒疾病的更佳之管道。另一個實驗目標以合成、設計胜? 類緣物，開發 Grb2 SH2 區塊之胜? 類抑制物 (inhibitor) 或拮抗物 (antagonist) 為主。乳癌細胞內訊息傳遞途徑之致病機轉 (oncogenic Ras signal transduction pathway) 中，一些生化機制之異常情形，可能與癌症的致病原因有關，例如：蛋白質 Grb2 的 SH2 區塊已被報導與癌症有關【5】。利用 BIAcore X 儀器之表面薄膜共振技術評估胜? 阻斷 Grb2 SH2 區塊與特定蛋白質交互作用之能力，探討每個胺基酸結構對生物活性之貢獻及重要性，從一系列胜? 類緣物中篩選出具有較佳抑制力之先導物 (lead compounds) - Fmoc-Glu-Tyr-Aib-Asn-NH₂，進行生物活性分析。民國九十一年我國西藥產值約新台幣 426.9 億元，其中絕大部分是小分子藥物。大部分的藥物以小分子藥物為主，因為小分子藥物的化學合成容易、容易保存、口服吸收方便等優點，使小分子藥物在治療上有無可取代的地位【6】。

第二章 文獻探討及研究動機

第一節 乳癌之研究及進展

台灣地區婦女乳癌發生率及死亡率的急速上升，在近二十年間，大概已上升二至三倍之多，而且這個趨勢並未有減緩的情形。台灣地區乳癌發生率上升的原因，一般認為和國人的生活習慣西化有十分密切的關係。乳癌主要致癌機轉是建立在女性荷爾蒙（主要是動情激素）對乳房細胞（或乳癌細胞）的促進增生作用上，因此西化的生活飲食習慣，包括營養的改善所進一步造成婦女初經年齡的提前、停經年齡的延後、停經後肥胖人口的增加，均會使得現代婦女相較於從前有更多的機會暴露在荷爾蒙的影響下，進一步增加乳癌發生的危險性【7】。

女性荷爾蒙對於乳癌的影響最早來自歐洲的觀察。十八世紀末，歐洲 Beatson 醫師發現將卵巢功能去勢後可以抑制乳癌的生長，甚至使乳癌腫瘤縮小；此一發現引發了醫學界的注意，繼而進一步探討女性荷爾蒙與乳癌的關係。根據實驗室動物實驗的觀察，女性荷爾蒙對於富有雌激素接受器的乳癌細胞有促進生長的作用；切斷女性荷爾蒙的供給或阻斷女性荷爾蒙對乳癌細胞的刺激，則會使乳癌腫瘤縮小。乳癌之形成與某些特殊基因之突變，如 BRCA1 與 BRCA2 基因，有極強之關聯性。根據研究，約有 5~10% 的乳癌來自遺傳，而這些家族性乳癌患者，約半數在 40 歲前就發現罹患乳癌，相較一般女性在四十歲前罹患乳癌之機率只有 5%，這些家族性乳癌患者罹患乳癌之平均年齡比一般婦女提早約十年。BRCA1 或 BRCA2 基因皆為自體顯性遺傳，也就是在所謂家族性乳癌/卵巢癌症候群中，一旦此基因產生突變，其家

族子代中所有成員皆有 50%之機會帶有此突變基因。在這些家族中，乳癌會不斷侵襲這些家族的家屬，像母親、姐妹、女兒、祖母或姨媽等(男性也會發生)。同時，這些家族罹患卵巢癌、子宮內膜癌的比例也相對地提高【8】。

乳癌病人治療通常以局部保留性乳房切除，80%手術後再接受放射線治療，71%另接受化學治療。目前化療過程使用最廣泛的藥物為 Tamoxifen，Tamoxifen 是一種模仿動情激素 (Estrogen) 化學結構的合成藥物。Tamoxifen 會與動情激素競爭動情激素接受器 (estrogen receptor) 的結合位置，進而阻斷動情激素對乳癌細胞的刺激，使乳癌的生長受到抑制，甚而造成乳癌細胞自然凋亡。但西元 1997 年有學者發現，原本用來治療乳癌藥 Tamoxifen 可能導致子宮頸癌【1】，所以積極開發副作用小或天然的抗癌成分便成為重要的研究方向。根據研究結果顯示，一位乳癌患者的治療成本費用，每人每年的治療平均費用為 111,771 元【9】。有鑒於每年乳癌患者逐漸增加，及乳癌造成家庭、社會消耗成本大幅成長，所以乳癌藥物的開發及日常的預防食品之積極研究，實有其必要性。

第二節 天然食材 - 黑豆之生理活性

黑豆是擁有黑色種皮的大豆，學名：*Glycine max* [L.] Merrill，大豆產品富含蛋白質，另外還包含一些成份如胰蛋白酶抑制劑、植酸、皂素及異黃酮化合物等，最近的研究發現這些成份對癌症及一些疾病具有預防的效果【10】。中藥裡，黑豆被認為擁有治療疾病的能力、化妝品之組成份及抗老化成分。

台灣有兩種黑豆，綠色子葉黑豆和黃色子葉黑豆。傳統上，綠色子葉黑豆用於醫藥上或泡酒。黃色子葉黑豆用於食品加工的材料【11】。黑豆的蛋白

質含量高達百分之三十六至四十，相當於肉類含量的兩倍、雞蛋的三倍、牛奶的十二倍；黑豆的十八種胺基酸含量豐富，特別是人體必須的八種胺基酸含量，較美國 FDA 規定的高級蛋白質標準還高。黑豆含有百分之十九的油脂，其中不飽和脂肪酸達百分之八十，吸收率高達九成五以上，除了能滿足人體對脂肪的需求外，還有降低血脂【12】的作用。膽固醇是許多老年性疾病的罪魁禍首，而黑豆具有抑制人體吸收膽固醇，降低血液中膽固醇含量的角色【13、14】。對於老年人而言，黑豆具軟化血管、滋潤皮膚延緩老化的保健養生功能，特別是對高血壓、心臟病、肝臟、動脈硬化等老年性疾病大有益處【15】。根據中醫理論，豆乃腎之谷，黑色屬水，水走腎，所以黑豆入腎功能多【16】，人的衰老往往先從腎機能顯現，想要延年益壽、防老抗衰，增強活力、精力，必須首重補腎。在中醫，黑豆入藥，黃豆不入藥，凸顯黑豆不同於黃豆特殊的祛疾保健功能。本篇研究所使用之黑豆為台南學甲農會提供之台南五號黑豆，是由台南區農業改良場培育而成（表 2-1），子實外觀碩大、平滑，蛋白質含量高於一般黃豆【17】。實驗上仿傳統豆漿製作過程製備黑豆豆漿，豆漿經由冷凍乾燥成粉末後定量，除了對乳癌細胞做生物活性測試外，並利用 RP-HPLC 分析其異黃酮組成與種類【18】。

表 2-1、黑豆新品種台南五號特性表

作物名稱	黑豆
新品種名稱	台南 5 號
原品系名稱	台南育 5 號(TC78-21)
品種來源	屏東選黑豆地方種(母本) x 潮州選黑豆地方種(父本)，採混合法育成
育成機關	行政院農業委員會台南區農業改良場
品種特性	<ol style="list-style-type: none"> 1. 植株性狀：幼莖紫色，羽狀三小葉，葉卵圓形，花紫色，株高 41-76 公分，分枝數 2-3 支，主莖節數 8-15 節，莢呈刀狀，褐色，被覆褐色茸毛，每莢 2-3 粒種子，種子橢圓，種皮黑色，子葉黃色，臍黑色，千粒重 231-255 公克，子實粗蛋白含量約 43%。 2. 生長習性：播種後 4-10 天發芽，開花期 30-41 天，生育日期春作 103-113 天，夏作 101-108 天，秋作 83-88 天，屬中熟，成熟度整齊，落葉性良好。 3. 本品種對露菌病、紫斑病之罹病較低，但生育期易受莖潛蠅危害。 4. 適應土壤：以壤土、砂質壤土最適宜，土壤的酸鹼度以 pH6.0-7.0 之間。 5. 子實產量：春作每作頃 2,552-3,153 公斤，夏作及秋作 1,820-3,568 公斤。 6. 台南 5 號的子實外觀優良，蔭油加工品質的鮮度、甘味及香味皆優於進口黑豆，適合製作蔭油、蜜黑豆、豆鼓及味噌之用途。

行政院農業委員會 89/05/05(89)農糧字第 890020398 號函

第三節 Grb2 SH2 區塊之胜? 抑制物

蛋白質之SH2區塊(Src homology 2 domains)在細胞內的訊息傳遞途徑中，扮演著非常重要的角色，由於活化的生長因子受體上具有許多包含有磷酸化酪胺酸之特定的胺基酸序列，會被許多種蛋白質之SH2區塊辨識出，進而與之結合或產生生物分子間的交互作用，誘發下游途徑中一連串蛋白質與蛋白質間之交互作用(圖2-1)【19】，進而將細胞外之訊息傳遞到細胞的內部，而影響細胞之增生或細胞之分化【20】。

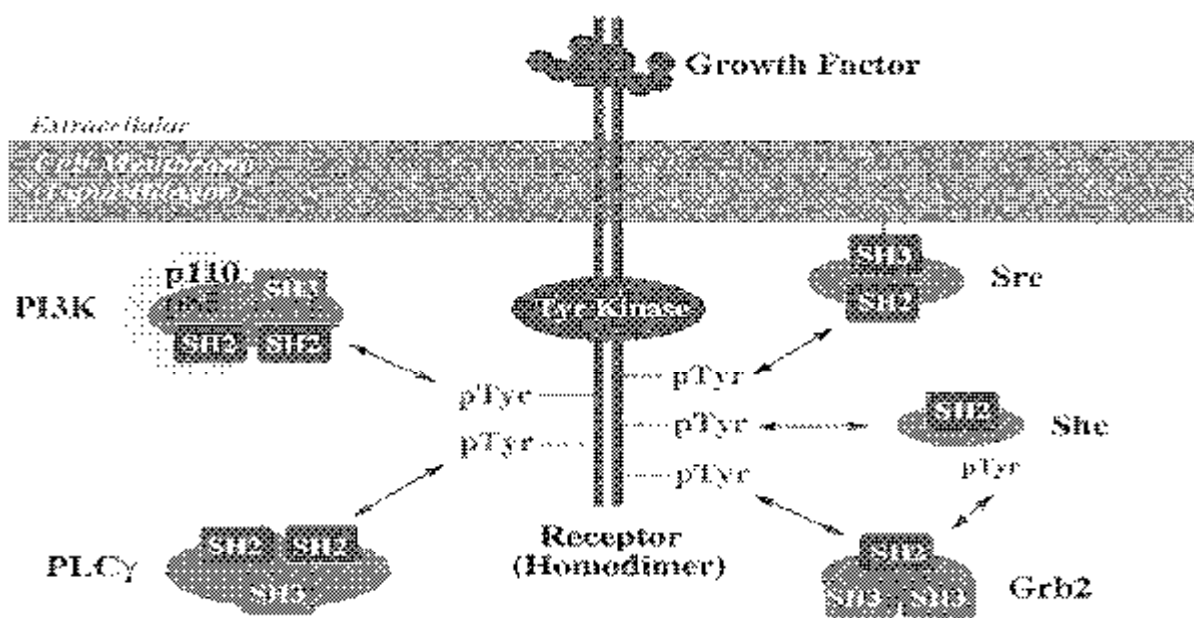


圖 2-1、與蛋白質之 SH2 區塊有關之訊息傳遞途徑【19】

細胞內訊息傳遞途徑中，一些生化機制之異常情形，可能與癌症的致病原因有關，例如：蛋白質Grb2的SH2區塊已被報導與癌症有關【5】，因此，實驗是針對乳癌之致病機轉(oncogenic Ras signal transduction pathway)，涉及反應的生長因子受體連接蛋白質Grb2 (Growth factor receptor bound protein 2)，以Grb2 SH2區塊為研究標的，探討其致病機轉中蛋白質與蛋白質間的

交互作用，並研發標的蛋白質SH2區塊之拮抗劑或拮抗物 (antagonist) 或拮抗物 (antagonist)，進行癌症治療藥物之研發。

蛋白質 Grb2 (Growth factor receptor-bound protein 2) 是一種與生長因子受體連結的蛋白質 (adaptor protein)，在訊息傳遞中擔任傳遞訊息的角色，其分子量為 25kDa，包含一個 SH2 (Src homology 2) 區塊和兩個 SH3 (Src homology 3) 區塊，其排列次序為 SH3-SH2-SH3。根據 1996 年 Rahuel 等人發表 Grb2 蛋白質 SH2 區塊與 BCR- ablphosphopeptide 所形成複合物之分子模型【21】，證實 BCR-abl 磷酸化拮抗劑的胺基酸序列 KPFpYVNV 與 Grb2 蛋白質之 SH2 domain 結合後，被誘發形成一個含有 β -turn 的結構，推測 β -turn 的結構也許有助於 Grb2 蛋白質上 SH2 domain 之辨識與結合 (圖 2-2)。

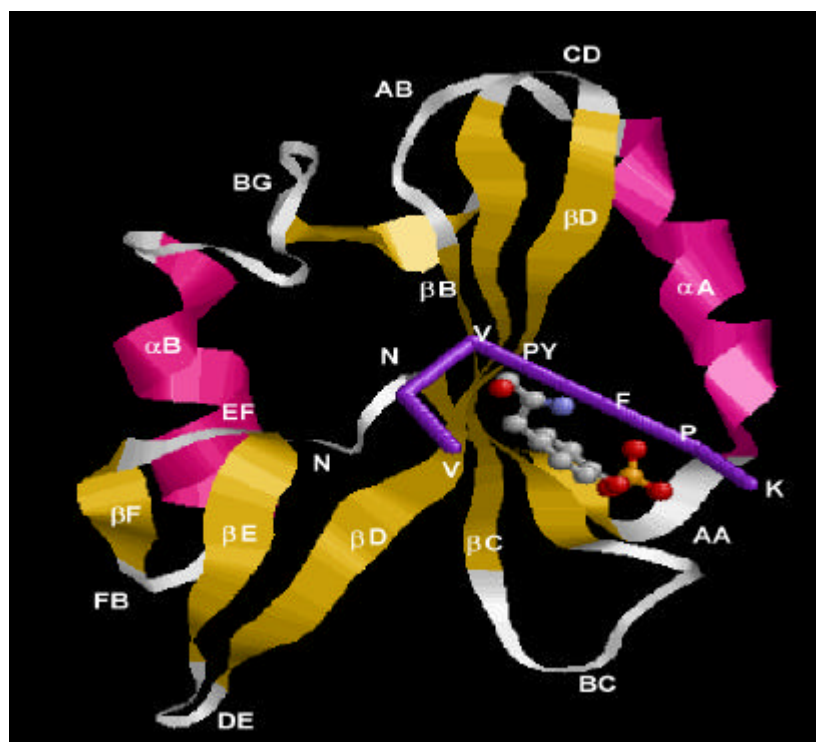


圖 2-2、Grb2 蛋白質與 BCR-ablphosphopeptide 所形成複合物之分子模型

與 Grb2 蛋白質之 SH2 domain 結合之胜? 具有 KPFpYVNV 之胺基酸序列及 β -turn 的結構【21】。

根據上述結構與活性關係之研究，故實驗以

小分子之線狀胜? (Linear peptides) 類緣物為設計方向，修飾鄰近磷酸化 tyrosine 周遭之胺基酸序列，期望所設計的胜? 與 Grb2 SH2 區塊結合，便達到阻斷 Grb2 SH2 區塊與其他訊息傳遞的相關蛋白質結合的目的，防止或減緩使癌細胞增生或誘導癌細胞分化之訊息傳遞，以抑制癌細胞增生或分化 (圖 2-3) 合成胜? 之設計選擇特別的非天然胺基酸 Ach 及 Aib 藉以誘導局部區域之 β -turn 構形。經設計、合成、純化、鑑定之六種胜? (圖 2-4) 再由表面膜漿共振技術探討各線狀胜? 類緣物與 Grb2 SH2 區塊之交互作用，並篩選與 Grb2 SH2 區塊最具親和性的胜? 作為乳癌細胞體外試驗 (in vitro) 之樣品。

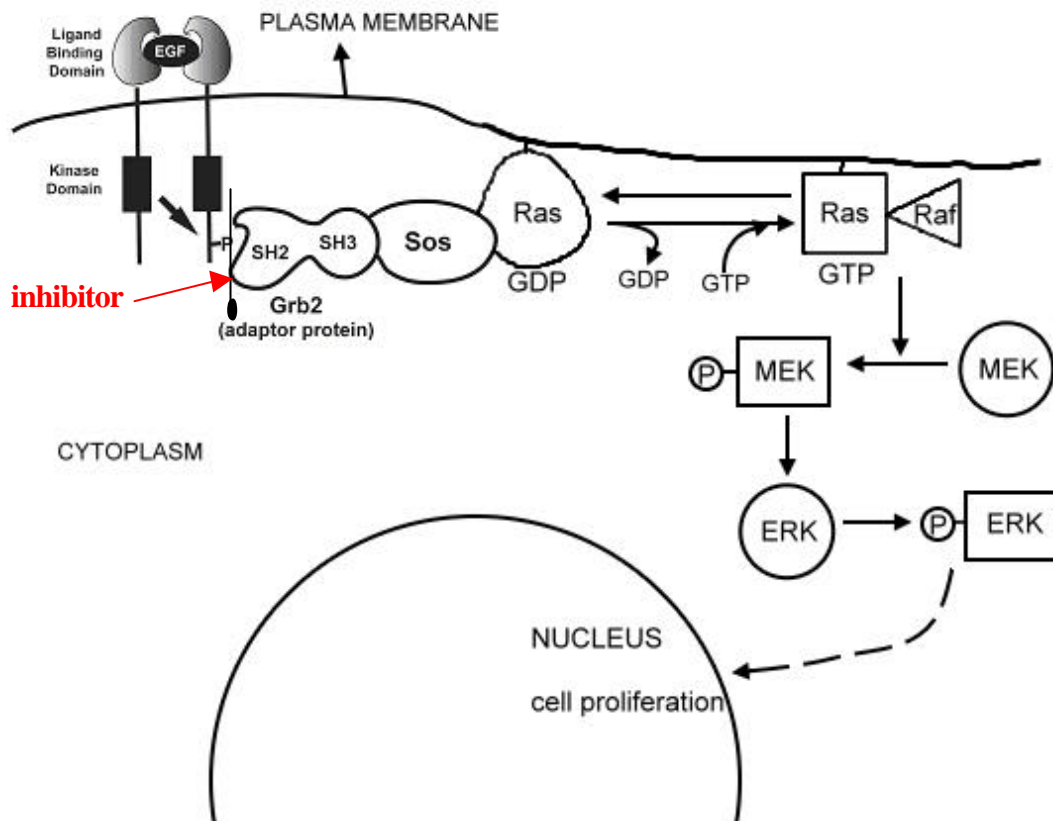
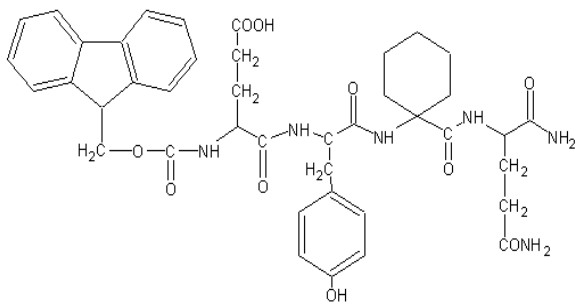
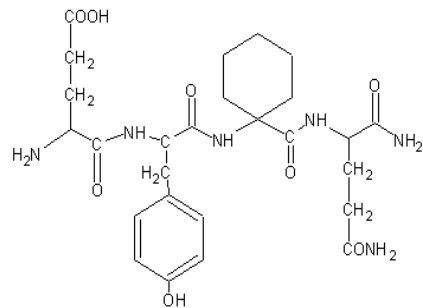


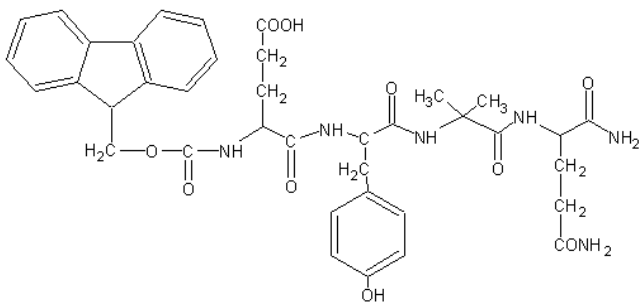
圖2-3、致癌基因Ras的訊息傳遞途徑(oncogenic Ras signal transduction pathway)
【22】



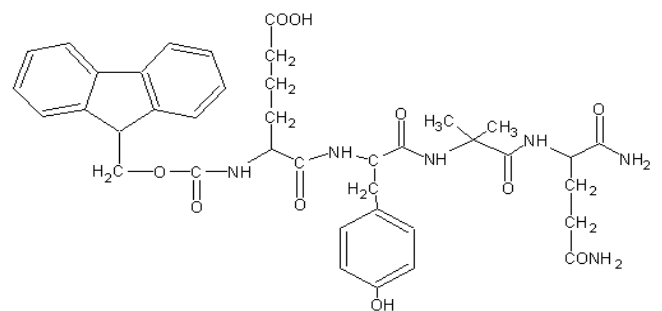
1, Fmoc-Glu-Tyr-Ach-Asn-NH₂



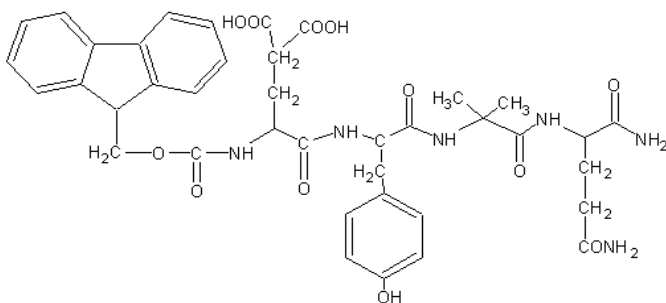
2, NH₂-Glu-Tyr-Ach-Asn-NH₂



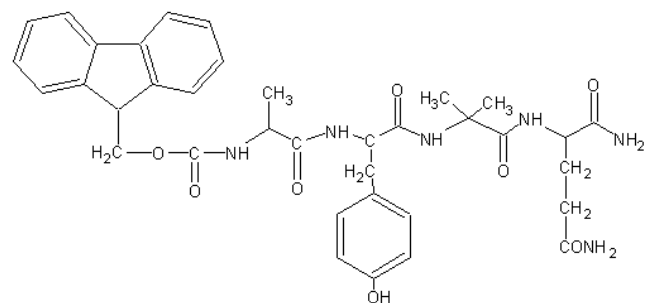
3, Fmoc-Glu-Tyr-Aib-Asn-NH₂



4, Fmoc-Adi-Tyr-Aib-Asn-NH₂



5, Fmoc-Gla-Tyr-Aib-Asn-NH₂



6, Fmoc-Ala-Tyr-Aib-Asn-NH₂

圖2-4 以結構為基礎所設計的小分子胜? 類緣物。1-6為之胺基酸組成及化學結構【23】

第四節 表面膜漿共振技術應用於 Grb2 SH2 胜? 抑制物之評估

一、生物感應器 BIAcore biosensor

表面膜漿共振技術 (Surface Plasmon Resonance technology, SPR technology) 是一項用於分析生物分子之間的相互作用的技術，它可以定性的判斷兩分子之間是否有相互作用，比較一種分子與其他幾種分子之間相互作用的強弱，也可以定量的測定分子間相互作用的親和力參數 (平衡常數) 和動力學參數 (速率常數) ，甚至熱力學參數 (反應的焓) 。該技術是利用了物理光學的原理，在研究兩分子相互作用時，將一種分子固定在晶片表面，而另一種分子的溶液流過其表面，兩種分子的結合會使晶片表面的折射率改變，因此檢測兩分子間的相互作用。1983年，瑞典LINKOPING理工學院應用物理實驗室Liedberg等人首先把它用於IgG與其抗原相互作用的檢測【24】，並由BIAcore公司研發出SPR感應器。

生物感應器為分析分子與分子間之交互作用有利的技術，在一些臨床的分析或是生化方面的研究特別重要【25】。生物感測器 BIAcore利用表面膜漿共振技術 (Surface Plasmon Resonance, SPR) 的原理進行檢測。當光束由光源發射後，入射光 (incident light) 射至玻璃稜鏡，於玻璃介質內傳導時，光路徑上遇金屬薄層界面交接處產生內全反射 (total internal reflection) ，並產生漸逝波 (evanescent wave) ，漸逝波與金屬薄層內的電子產生共振作用 (resonance reaction) ，入射光能量被吸收，反射光能量降低，並且在特定的反射角範圍內會引起反射角度的急劇變化。

當光線到達金屬薄層時會發生全反射的狀況，並且有部分能量會被傳遞進入非照射端的介質中。當非照射面因介質組成濃度或成分發生改變時，會使光的折射係數發生變化，並會將此變化反應到共振角度 (resonance angle)

上，SPR共振角度所對應的訊息（resonance signal）對時間做圖，可得到一感應圖（sensorgram），其縱軸為共振單位，橫軸為時間（圖 2-5）。

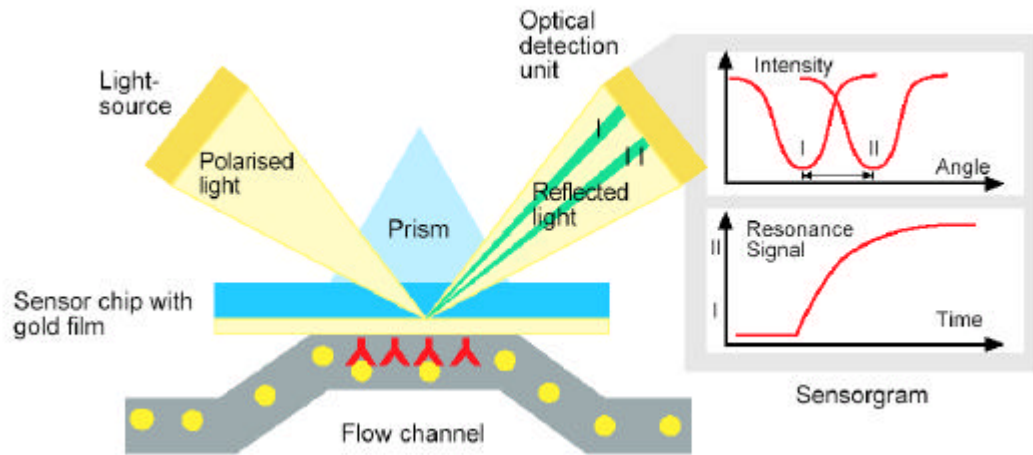


圖2-5、BIAcore感測原理示意圖

BIAcore是一種以親和性(affinity)為主體的生物感測器，以固定化的方式，選擇具有生物特異性的鍵合物(ligand)以共價結合的方式結合在感應晶片聚葡萄糖基質(dextran)的表面上，再靠著流體系統的循環下，以控制流速將待測物注射到感應晶片表面。當分析物與鍵合物有相互作用的發生，表面質量濃度的改變，進而影響折射率的變化，而SPR的光學反應也即時感應並且表現於感應圖(sensorgram)上，即時反應出樣品與晶片上固定之物質結合及解離情形。

由於光線穿透的強度只會達感應晶片表面附近，因此產生的訊號並不會穿過檢體的溶液。且由於檢體的溶液或其反應試劑在遠離光線的區域並不會發生反應，因此可避免因溶液本身所產生的突然上升的訊號（bulkeffect）。影響 SPR 的共振角度變化的原因最主要是由於非照射面，即反應層介質的折射係數的不同，在即時性偵測系統的 BIAcore 中，介質的反射係數會隨著其溶液的濃度而發生變化。反應作用發生時電子吸收能量，導致在特定的反射

角範圍內，反射強度急劇驟減，達到最小。這種最小化發生時的角度稱為共振角(圖 2-6 : a)，共振角度隨著非照射面金屬箔層鄰近介質的折射係數 (refractive index)之不同而有所變化(圖 2-6 : b)，因此，當環境介質因組成、濃度或組成改變時，例如，待測物結合到感應晶片表面之鍵合物時，所導致的折射係數變化則可以藉由共振角度位移變化偵測出。所得的曲線為感應曲線圖(圖 2-6 : c)

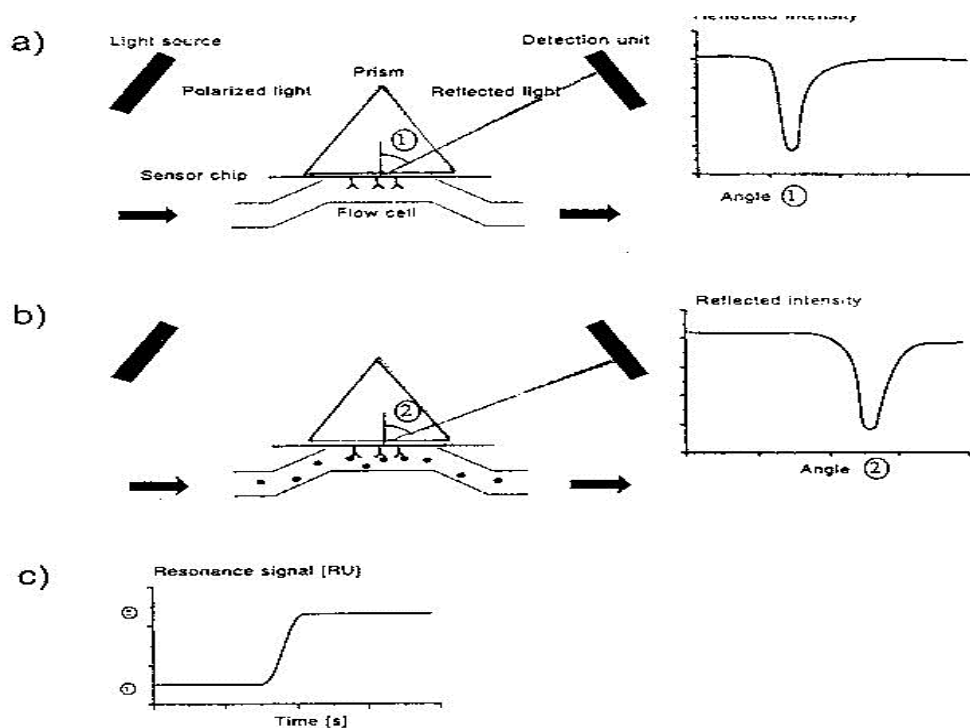


圖 2-6、SPR 共振角度變化隨著溶液中待測物濃度改變而發生變化

(a) 表示反應作用發生時電子吸收能量，導致在特定的反射角範圍內，反射強度急劇驟減，達到最小。這種最小化發生時的角度稱為共振角。(b) 共振角度隨著非照射面金屬箔層鄰近介質的折射係數之不同而有所變化。(c) 當環境介質因組成、濃度或組成改變時，例如，待測物結合到感應晶片表面之鍵合物時，所導致的折射係數變化則可以藉由共振角度位移變化偵測出。所得的曲線為感應曲線圖。

BIAcore在進行即時性的分子間交互作用分析時，當受測物與感應晶片表面之鍵合物正在進行結合（association）作用，會出現一段上升的曲線。當結合的情形時間發生的越快時，且RU值變化越高時，則表示受測物和晶片表面之鍵合物有較好的親合力（higher affinity），反之，若結合情形發生的時間慢且RU值變化較不明顯時，表示受測物和感應晶片上表面之鍵合物間親合力不佳。當受測物和感應晶片上的鍵結物正進行解離（dissociation）作用時，會出現一段下降曲線。當解離的時間越長，表示受測物和感應晶片上的鍵結物有較好的特異性（specific），因此不容易發生解離。反之若解離情形的時間越快，表示受測物和感應晶片上的鍵結物特異性不佳（圖2-7）。

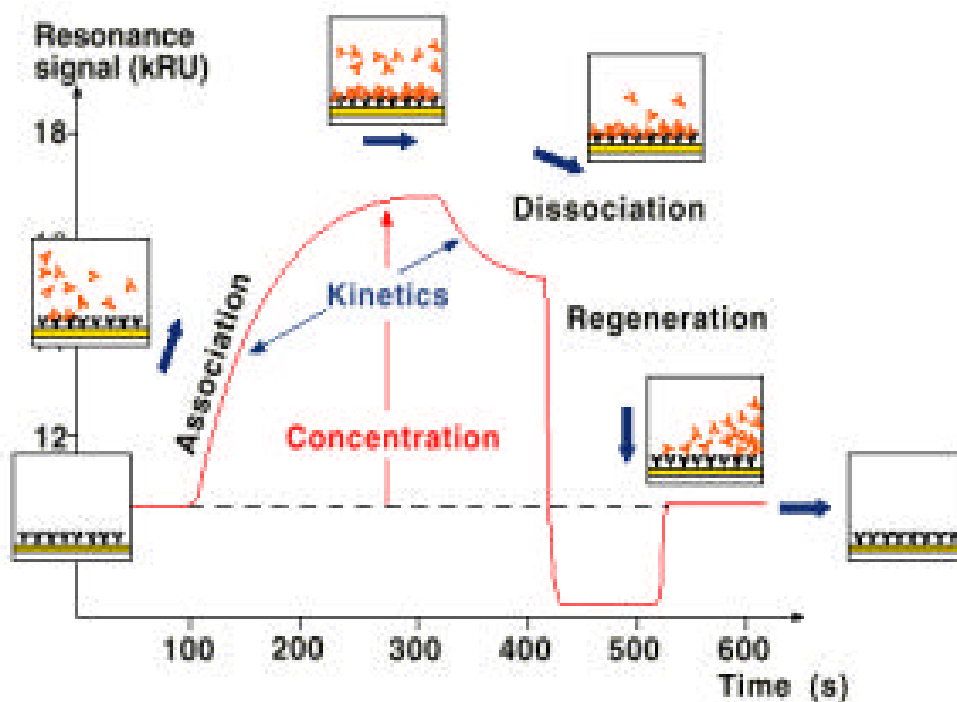


圖2-7、BIAcore進行即時性的分子間交互作用分析

受測物與感應晶片表面之鍵合物正在進行結合作用時，會出現一段上升的曲線。當結合的情形時間發生的越快時，且RU值變化越高時，則表示受測物和晶片表面之鍵合物有較好的親合力（higher affinity），當受測物和感應晶片上的鍵結物

正進行解離作用時，會出現一段下降曲線。當解離的時間越長，表示受測物和感應晶片上的鍵結物有較好的特異性，因此不容易發生解離。

BIAcore 儀器解離方式有三種模式：(1) Normal mode injection：在樣品注入完畢後，微射流系統會以大量的緩衝液 (buffer) 以最高流速沖刷感應晶片表面，將晶片表面的物質之結合物沖刷掉。(2) Delay-wash mode injection：可設定微射流系統在樣品注入完後數秒後，再以最高流速沖刷感應晶片表面，將感應晶片上的結合物沖刷掉。(3) Non-wash mode injection：感應晶片上的結合物在檢測流程所設定的流速下慢慢發生自然的解離作用。BIAcore 儀器備廣泛應用於探討蛋白質與蛋白質之間之交互作用情形，亦可應用開發於免疫檢定的定量系統，當待分析物流過生物感測器晶片之表面時，不需要使用放射線或其他偵測試劑，即可即時偵測附著到固定於晶片表面之配位基 (ligand) 上待分析物 (analyte) 的量，此程序可以監視混合物彼此之間的生物性反應，可提供動態資訊、偵測結合速率常數、解離速率常數及訂定親和力常數。

二、BIAcore 儀器之組成

BIAcore 生物分子相互作用分析系統是用在探測分子間相互作用的生物感測器。其也是一種以親和性 (affinity) 為主體的生物感應器【26】，利用具有生物特異性的鍵合物 (ligand) 以共價結合的方式固定至感應晶片的聚葡萄糖 (dextran) 表面。再以電腦控制微射流系統 (IFC) 的流速，將樣品送達感應晶片的表面。當樣品中特定的分析物和感應晶片表面的鍵合物發生專一性作用後，會造成感應晶片上質量濃度的改變，進一步影響到折射率的變化，

並即時反應在感應分析圖上 (sensorgram)。分析物的選擇性和鍵合物的結合具有專一性，並且可分析複合物之交互作用。而這些反應必須依賴著 BIAcore 三大主要的基本系統【27】：(一)感應晶片表面系統 (二)SPR 之光學系統(三)液體傳送之微射流系統(圖 2-8)。

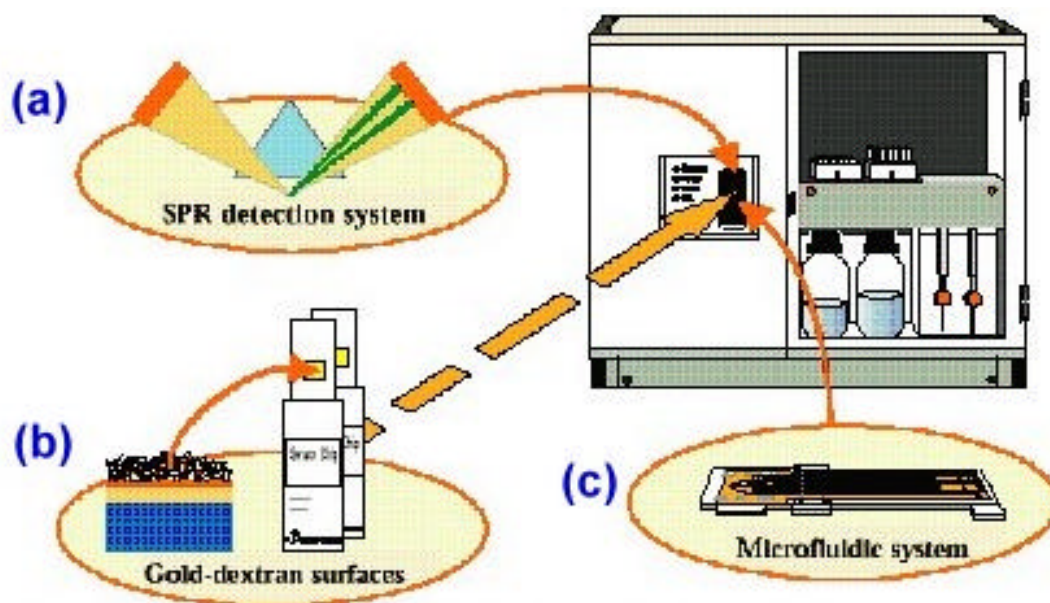


圖 2-8、BIAcore 儀器中三大主要基本系統

(a) SPR 光學系統 (b) 感應晶片表面系統以及 (c) 液體傳送之微射流系統 (Microfluidic system ; Intergrated Fluidic Cartridge, IFC)。

(一) 感應晶片表面系統

感應晶片是 BIAcore 即時訊號的傳遞者，其主要構造構造可以分為四個主要部分，包括玻璃稜鏡層(glass prislmlayer)、金箔層(gloden film)、連接層(linker layer)和專一反應層(specific layer)，專一反應層是由 carboxymethyl group 所構成，其晶片結構如 (圖 2-9)。金箔層具有化學不活潑的性質且和 SPR 有很好的反應，其表面有專一反應層其和金箔表面以共價鍵結，其是提供生物分子固

定用。其具有 4 種功能：(1) 利用已知的化學特性將生物分子固定 (2) 增加表面的結合能力，以增加靈敏性。(3) 提供親水性環境，可適合大多數生物反應時交互作用。(4) 提供表面較低的非特異性鍵結，因此具有非常高的專一性結合。在感應晶片的非照射面與溶液接觸後開始相互作用，透過 SPR 的產生來偵測生物分子在晶片表面的濃度變化。因此實驗的成功與否和選擇適合的鍵合物、感應晶片與固定方法都有很大的相關性。

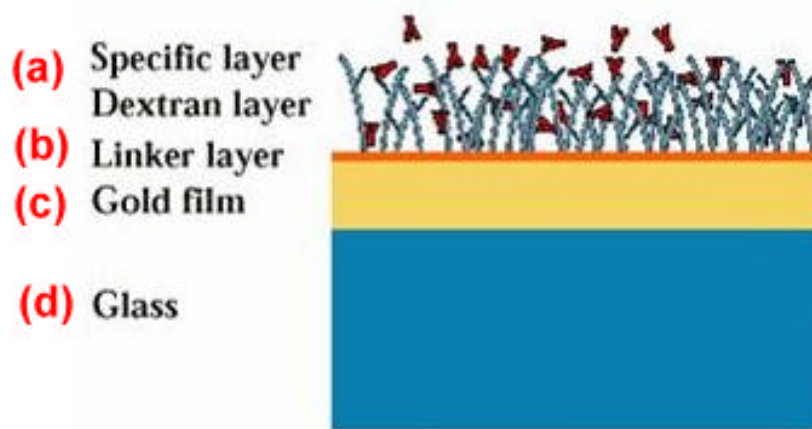


圖 2-9、BIAcore 之感應晶片主要構造

BIAcore 感應晶片主要構造可分為四部份 (a) 部分為專一反應層 (specific layer)，其專一性反應層是由 carboxymethyl dextran 所組成 (b) 部分為連接層 (linker layer) (c) 部分為金箔層 (gold film) (d) 部分為玻璃稜鏡層。

a. 鍵合物 (ligand) 的選擇

鍵合物的選擇必須注意的首先是專一性 (specificity) 要高，因為專一性高的鍵合物對於溶液中眾多的分子才具有篩選的功能；此外是再生的穩定性 (regeneration stability) 要好【24】，當反應作用完成後，感應晶片表面必須經過再生作用，也就是要將受測物去除，才能針對另一樣品作分析，在這樣的過

程中，鍵合物仍然要繼續保持本身原來的活性；另外，固定於晶片上之鍵合物的純度應該愈純愈好，需要有90% pure及均質性以避免有非專一性的結合(non-specificity binding)，其濃度在於0.5和5 mg/mL。另外鹽類濃度要低於200 mM，且不含有可能會反應的化合物例如Tris, glycine 或再進行胺基共價結合反應時的BSA。最後鍵合物的大小(size)要能愈小愈好，如果鍵合物大，而待測物與鍵合物產生反應的RU值變化，相對的比較不明顯，因為鍵合物的感應圖反應會與本身的質量成正比的關係。

b. 感應晶片 (sensor chip)

除了鍵合物之選擇外，選擇適當的感應晶片也是相當重要的，不同的感應晶片適合不同的目的，然而所有都是運用相同的光學原理，最重要的是選擇適合的固定化模式。本篇實驗中所使用的是 CM5 之感應晶片。

CM5 感應晶片是一般實驗上較常被使用的晶片，其專一性反應層是由 carboxymethyl dextran 所組成，其提供了相當好得親水性環境，再根據鍵合物的性質和研究上的需要，選擇不同的化學方法進行偶合(coupling) 在 BIAcore 系統中固定的方式，以利用胺類偶合法 (amine coupling) 最多【27】，尤其在蛋白質交互作用方面。其主要原因是因為大部分的蛋白質具有胺類的官能基 (-NH₂)，因此可以和 CM5 sensor chip 中的 carboxymethyl dextran 經活化後的羧基 (-COOH) 形成醯胺鍵 (-CONH-)。

c. 生物分子的固定

將生物分子固定於感應晶片表面時，首先必須活化晶片之表面，CM5 感應晶片表面之 carboxymethyl dextran 活化，是利用 0.05M NHS (N-hydroxysuccinimide) /0.2M EDC (N-ethyl-N-dimethylaminopropyl carbodiimide hydrochloride) 活化，接著利用胺類偶合的方式，將生物分子固定於感應晶片表面。胺類偶合法 (amine coupling) 是利用胺基的氮原子未配

位電子去進行所謂的親和性取代的反應。使用胺類偶合法有幾個變數要注意的，分別是：PH 值、鍵合物的濃度和反應時間，若鍵合物是酸性蛋白質，則氮原子質子化的結果會降低固定時的效率；如果被固定的胺基剛好是鍵合物的活性區 (active site)，則會導致整個反應活性的降低，因此若能將這些變數加以控制，則在設計相互作用的研究上是相當有力且簡便的工具。

(二) SPR 光學系統

BIAcore 儀器其光線來源是一個高效能接近紅外線光的兩極真空管發射出來，光源是以一定入射角的楔形(wedge-shaped) 照射，光將注射焦點落於感應晶片上。當 SPR 的反應被監測到時，電腦內附的程式軟體會自動計算因為待測物濃度不同而改變的角度，也就是共振角度。

(三) 液體傳送系統

液體傳送系統是一個具有精確的幫浦與微射流卡夾 (integrated fluidic cartridge) 簡稱 IFC。BIAcore 是一種半自動的生物感應器。當欲分析的樣品以人工的方式注射進入後，會被保留在具有溫度控制 (一般控制於 25) 的標準的微射流盤的樣品通路 (sample loop) 內，並藉由全自動的微射流系統使分析物達到感應晶片表面。IFC 的表面有精密正確的凹槽，藉由機器的幫助使它與感應晶片的流路(Flow cell , Fc)接觸，Fc 只需少量的樣品傳送於感應晶片的表面即可進行分析，IFC 和瓣膜的操作可以很快的改變樣品與緩衝液於感應晶片表面和有能力去控制樣品接觸於表面時間的正確性與再生性。

三、BIAcore 儀器即時偵測之優點

BIAcore 是利用表面膜漿共振技術(SPR)的技術，來偵測分子與分子之間相互作用的儀器【28、29】，這是一個非侵入性的光學測量技術，能夠測量生物在感應晶片表面上質量濃度的變化。BIAcore主要的特色就是運用表面薄膜共振技術(Surface Plasmon Resonance, SPR)在不需要任何標定物的狀態下【30】，可以在低濃度（ 10^{-6} g/mL到 10^{-11} g/m）下分析任何兩種生物分子間相互結合或解離的情形，並可進行即時性的偵測【31】。此技術之應用範圍很廣，其中包括：生化上的基本研究、生物分子應用於藥物的設計研發【32】、蛋白質之間的相互作用【33、34】、親和力【35】以及濃度的測量【36】，以及篩選欲探討的分子及分子間之交互作用。

BIAcore X為一半自動生物感測系統，符合篩選樣品的數量、分析快速、精準的研究需求。它有著以下幾個優點：(1) 即時監測【31】；也就是立即顯示反應分子結合和解離的情形，另外追尋它們之間發生的相互作用，對於引導實驗條件的建立是很有用(2) 不需任何標定物的分析方法【30】；BIAcore利用SPR的光學原理，直接偵測反應表面上生物分子因相互作用而結合、解離所導致的質量改變，不需先做分子純化及標定的繁雜過程。(3) 自訂的生物特異性反應表面【37】；因為具備多種的反應片，可以針對反應分子的種類選擇適當的感應片，利用所建立的表面固定程序，制定出具有生物特異性的結合表面。(4) 欲分析之樣品僅須微量即可檢測【38】。BIAcore利用獨特設計的超微量液體匯流卡(Integrated Fluidic Cartridge, IFC；微射流系統)，所需的樣品體積極少，同時由電腦精確的控制分子與分子之反應時間及流速。(5) 快速分析【38】；即時的分析相互作用，一般分析的時間為2~10分鐘即可，晶片表面的再生也是同樣的快速。(6) 高靈敏度且同步之偵測；靈敏度依待測物的分子量而異，待測物分子量大於2000道爾吞(Dalton)，靈

敏度高達 10^{-9} ~ 10^{-12} M。

四、應用表面膜漿共振技術評估胜？對Grb2 SH2之抑制作用

SPR感應器的研究與改良迅速發展，其在生物醫學中的應用也日益廣泛，包括免疫學、蛋白質相互作用（信號傳導、胜？庫和抗體篩選、分析蛋白質的突變等）、蛋白質-核酸相互作用（修復、轉錄等），還有藥物-蛋白質作用（藥物篩選等）。將合成之胜？衍生物利用BIAcore儀器之表面薄膜共振技術評估其抑制Grb2 SH2區塊之能力，可得每一個合成胜？及Grb2 SH2蛋白質之動力學常數(k_{ass} , k_{diss} , K_A)，並探討每個胺基酸結構對生物活性之貢獻及重要性，這些結構活性關係的結果及所建立之篩選方法，可提供未來修飾環狀結構及胺基酸組成之設計方向。

第五節 固相胜？合成法 (*Solid-phase Peptide Synthesis*)

西元1984年諾貝爾化學獎得主 R.B. Merrifield 因固相胜？合成法 (Merrifield, 1963)名留青史。固相胜？合成法根據於 α -胺基和支鏈被保護的胺基酸殘基連續的加成到一個不可溶解的聚合物之支持物 (support) 上。本研究所使用的固相支持物為PAL resin (5-(4-Fmoc-aminomethyl-3,5-dimethoxyphenoxy)-valeric acid-MBHA (methylbenzhydrylamine)resin)，首先將樹脂 (resin) 上之含有鹼性不穩定的保護基 (Fmoc)，去保護基後活化 (activation)，接上第一個胺基酸，便完成了羧基端 (-COOH) 第一個胺基酸。Fmoc基所扮演的角色是胺基酸的N- α -保護 (N- α -protection)。在移除第一個

胺基酸的N端保護基後，使用偶合試劑，下一個被保護的胺基酸才被加入。重複上述步驟便產生胜? 鏈，其胺基酸之C-端被附著在此樹脂上，此胜? 可以利用TFA (Trifluoroacetic acid) 從樹脂分離【39】。

第六節 流式細胞儀 (flow cytometer)

流式細胞儀包括液流系統、光學系統、分選系統和電子系統。待測樣本經液流系統傳送依序地通過流式細胞儀中雷射照射的區域，受雷射的激發產生信號，被信號接收器接受並放大，這些放大的信號經電腦分析處理，並以圖表的形式直觀地顯示出來。流式細胞儀產生並分析的信號主要有光散射信號和螢光信號。依螢光素的不同，用不同波長的光激發，發射出不同波長的螢光，可顯示不同的顏色。細胞膜有損傷的細胞的 DNA 可被 PI 著染產生紅色螢光，而細胞膜保持完好的細胞則不會有紅色螢光產生【40】。

第七節 細胞週期 (Cell cycle) 之調控

由幹細胞(stem cell)分化到完整的細胞，真核細胞(eukaryotic cell)不是處於有絲分裂就是停止在休眠狀態。大致而言，我們可將複雜的細胞增殖現象分為三個時期：細胞生長期、DNA 複製期、細胞分裂期，這個過程稱為細胞週期。細胞週期可分為 Interphase(G₀, G₁, S phase, G₂)及 M phase【41】(圖 2-10)。Gap 0 (G₀)：細胞處於休眠期，可能為暫時性或永久性的停止生長，若細胞以發展到最後階段便不再生長，如神經細胞。Gap 1 (G₁)：此期之細胞開始生長，細胞大小增加，同時產生 RNA 及合成蛋白質，目的是為 DNA 複製做好準備。Synthesis (S) phase：為了使分裂後的二個子細胞相似，必須複製使含量增加一倍。Gap 2 (G₂)：DNA 複製到有絲分裂的期間，細胞會持續生長並產生新的蛋白質。Mitosis (M) phase：這個階段的細胞停止生長及蛋白質合成，所有細胞的能量集中在複雜而有規律性的細胞分裂以期得到兩個相似之子細胞。Leland Hartwell 提出了其中 G₁ 及 G₂ 期各含有檢查點 (checkpoint)，真核細胞的細胞週期中，共有三個檢查點，第一個檢查點在 G₁ phase 的晚期，也就是要進入 S phase 前的檢查點，稱之為 G₁ Checkpoint，它主要檢查細胞的大小、營養、生長因子，以及 DNA 是否受損；第二個檢查點在 G₂ phase 的晚期，也就是要進入 M phase 前的檢查點，稱之為 G₂ Checkpoint，它主要檢查細胞的大小和 DNA 的複製過程是否完全，每次進入 S 期或 M 期檢查是否一切準備就緒，才可以接著進行 DNA 的合成或是細胞分裂作用。

在 G₁ Checkpoint 和 G₂ Checkpoint 當中，要是 DNA 有受損，細胞就會進入 Rest state (G₀)，待 DNA 修補完後再進入下一個 phase，在 M phase 的過程中也有一個檢查點，稱之為 Spindle Assembly Checkpoint，它主要檢查染

色體是否附著在紡錘體 (spindle) 上。在文獻中指出，當 DNA 受損時，週期便無法通過檢查哨而停下 (Cell cycle arrest)，此時細胞內會進行 DNA 的修復，一旦修補完成時才進入下一期，若是發現有無法彌補的錯誤時，細胞則選擇走向凋亡 (apoptosis)，以避免錯誤遺傳至下一代【42】。在真核細胞中，藉由連續的訊息，經過活化，與隨後一系列特殊的 Cyclin-CDK(Cyclin-CDK complex)的活化與否來調控細胞週期進行，讓細胞增生。對於多樣的抑制增生 (antiproliferative) 訊號，包含有 DNA 損傷 (DNA damage)、分化 (differentiation)、接觸性抑制 (contact inhibition)、和衰老 (senescence)也會促使 CDK 的抑制者來負向調控細胞週期的進行【43~45】。

調控細胞週期進行的蛋白稱為 Cyclin，而調控 Cyclin 活化的則是一些 Cyclin-dependent kinase(CDK)。Cyclins 家族，主要在細胞週期中被合成。Cyclin-dependent kinases (CDKs)是一群蛋白激酶家族，會和特殊的 Cyclin 結合而活化。目前已知至少有 8 種 Cyclins 的存在，分別為 A、B_{1,2,3}、C、D_{1,2,3}、E、F、G 及 H，他們在 N-端與 CDKs 鍵結的地方都具有約 150 個胺基酸的不同區域，稱之為 cyclin-box【48~51】。Cyclins C、D 以及 E，主要存在於 G1 時期，並在 G1-S 的過渡期間被分解【51】。而 Cyclins A 與 B 被稱為 mitotic cyclins，穩定的存在於 interphase，但在 mitosis 時會迅速分解【46、49】。而 Cyclin H 則會和 CDK 7 形成一具有酵素活性的複合物，進而活化 cdc 2 (CDK1) 及 CDK2【52、53】。這些 Cyclin 與 CDKs 會形成複合物，而此複合物的活化與分解則調節著週期的進行。目前已知共有 7 種 CDKs 被發現，分別是 cdc 2 (CDK1)、CDK2、3、4、5、6、7。細胞在 G0/G1 時期，CDK4、5 及 6 會和 Cyclin D 家族結合；而 CDK2 也會與 Cyclin D 家族結合，但主要還是在 G1 及 G1-S 過渡期與 Cyclin A 及 E 結合。如上述所提及，CDK7 會與 Cyclin H 結合，並磷酸化 cdc2、CDK2 或 RNA polymerase 的 C 端次單元體

【52、53】。cdc2主要存在 S、G2 以及 M 時期，並與 Cyclin A 及 B 結合【54】細胞週期中，除了上述 Cyclin 與 Cyclin-dependent kinases 的正向調控因子外，另有一家族擔任著負向調控的角色，稱之為 Cyclin-dependent kinase inhibitors(CDKI)【47】【55、56】。在哺乳類細胞中，CDKI 主要可分為兩大族群，一為 INK4 家族，另一為 KIP/CIP 家族。在 INK4 家族中，主要成員有 p14、p15(INK4B)、p16(INK4A)、p18(INK4C)以及 p19(INK4D)，其功能為抑制 Cyclin D/CDK4 與 Cyclin D/CDK6 而達 G1 時期的控制。另一個族群為 KIP/CIP 家族，包括了 p21(CIP1/WAF1/SDI1)、p27(KIP1)以及 p57(KIP2)。KIP/CIP 家族所影響的層級較 INK4 家族為廣，其所調控的蛋白包括 Cyclin E/CDK2、Cyclin D/CDK2、Cyclin D/CDK6、Cyclin A/CDK2 及 Cyclin B/cdc2 等【47】。

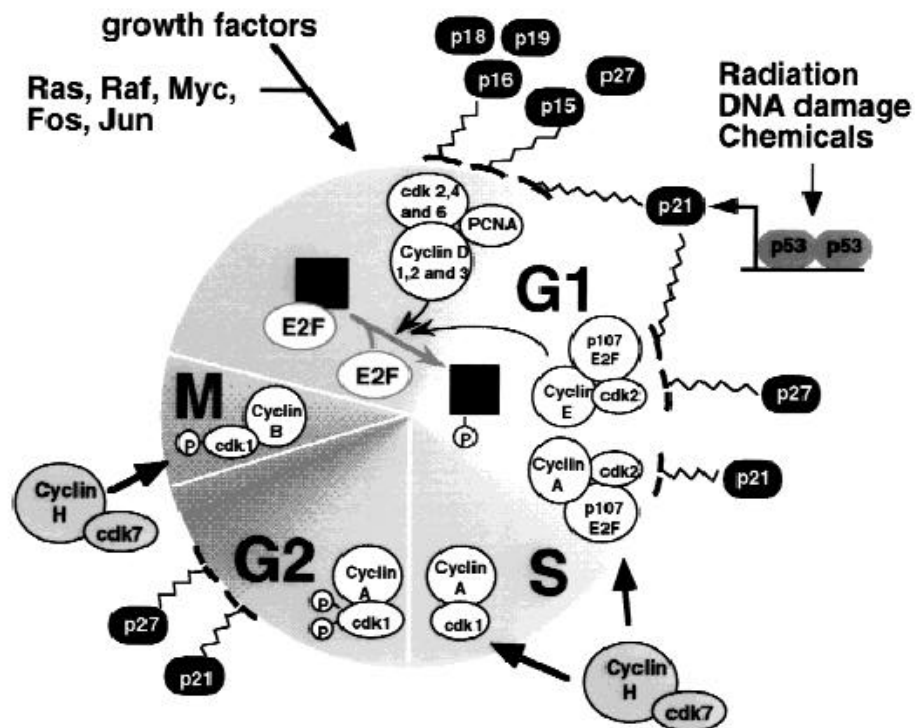


圖2-10、細胞週期調控圖示【57】

第八節 細胞凋亡 (Apoptosis)

一、細胞凋亡之定義

細胞凋亡(apoptosis)一詞最早是在 1972 年由病理學家 John Kerr 所提出【58】，原本字面的意思是指樹葉凋落或掉落。細胞凋亡又被稱為生理上的細胞死亡(physiological cell death)或是計畫性的細胞死亡(programmed cell death)，在生理上扮演著相當重要的角色【59~61】。例如在胚胎發育或是精子的形成過程中都會發生細胞凋亡。除此之外，當正常的細胞受到傷害而發生基因突變時，也會自動引發細胞凋亡的機制使突變的細胞死亡，避免突變的遺傳【62】。而在病理學上，也有一些疾病與細胞凋亡有關，例如阿茲海默症【61~64】。

二、細胞凋亡時之分期

細胞凋亡主要是發生在單一細胞中。它可分為兩個時期，早期(early stage)以及晚期(later stage)。細胞凋亡早期時，會出現染色質濃縮(compaction of nuclear chromatin)、細胞質濃縮(condensation of cytoplasm)以及細胞皺縮(shrunken)等特徵；到了晚期，細胞核會開始發生裂解，然後形成凋亡小體(apoptotic bodies)。在細胞凋亡過程中，並不會發生胞器或是胞膜破裂，因此不會引起發炎反應或危害到周圍組織。

三、細胞凋亡 (apoptosis) 與細胞壞死 (necrosis) 之分別

細胞壞死會同時發生在一群細胞，也可分為早期與晚期兩個時期。在細胞壞死早期，細胞內之胞器會脹大，細胞膜也會破裂；到了晚期細胞膜也發生破裂【67~69】。由於細胞發生破裂，因此會釋放出一些發炎物質而引起局部發炎反應，傷害到鄰近的細胞或組織（圖 2-11）。

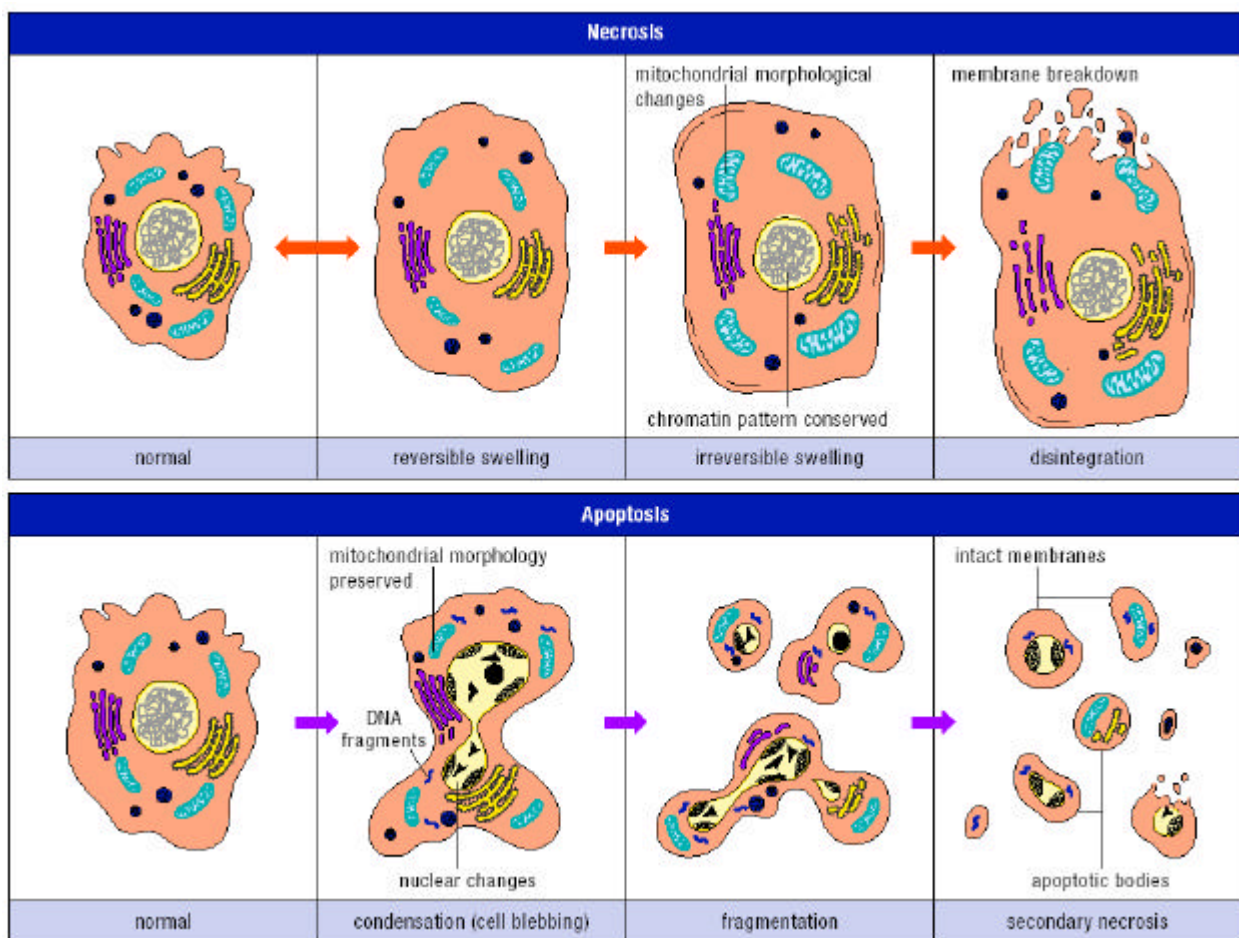


圖2-11、細胞凋亡 (Apoptosis) 與細胞壞死 (Necrosis) 的區別 【70】

四、細胞凋亡時的生化變化與特徵

(一) DNA 降解

當細胞凋亡進入晚期時，細胞內的核酸內切酶會被活化而將 DNA 隨之分解，產生 180~200 bp 或其倍數的 DNA 片段。此時藉由 1.8% 的 agarose gel 進行電泳時，會出現特殊的梯形電泳帶。此為細胞凋亡時之明顯特徵【71】。

(二) 細胞鈣離子濃度改變

細胞凋亡早期時可偵測到細胞內鈣離子濃度之上升【72、73】。研究發現 Ca^{2+} 增加與 ATP 一起作用於染色質，使原來折疊的很緊的染色質變鬆散，露出親水部分，以便 Dnase 水解。

(三) Caspase enzyme family

當細胞發生凋亡時，細胞內有一系列的蛋白水解酵素(Cysteine dependent aspartate specific protease)會被活化，這些 Caspase 活化之後，會裂解其他細胞內的酵素，造成細胞形態之改變【74、75】。Caspase 家族有許多成員，目前研究至少已經發現 14 種的 Caspase 存在。根據他們的同源性，可大致分為三類【76、77】：

a、The ICE subfamily of cytokine processors

此類 Caspase 有 Caspase 1、4、5、11、12、13、14，此類 Caspase 的功能與發炎反應有較大的關係。

b、The ICH-1/Nedd-2 subfamily of apoptotic initiators

此類 Caspase 有 Caspase 2、8、9、10，而此類 Caspase 的功能，則負責活化 apoptotic executioners 使其能執行 apoptosis。此類 Caspase 在結構上，N 端具有較長的 prodomain，如：Caspase 8、Caspase 10，其 N 端 prodomain 具

有兩個 death effector domain(DED) , 來與下游的 adaptor molecule C 端的 DD domain 連結 , 以傳導來自 Death receptor pathway 的 death signals 而在 Caspase 9 上 , 則具有 CARD(Caspase recruitment domain)位於 prodomain 上 , 此 CARD domain 可與 Apaf-1 上 N 端的 CARD 結合 , 傳導來自 mitochondria pathway 的 death signals。

c 、 The Ced-3/ CPP32 subfamily of apoptotic executioners

此類 Caspase 有 Caspase 3、 6、 7 , 而此類 Caspase 的功能則負責執行細胞凋亡 , 裂解其下游的蛋白質如 : Poly(ADP-ribose) polymerase(PARP)、 DNA-PK(DNA-dependent protein kinase)...等 , 改變細胞原本作用。這類 Caspase 在其結構上 , N 端的 prodomain 較短 , 能分解細胞內的蛋白質如 : Poly(ADP-ribose) polymerase(PARP) , 此蛋白質為 Caspase 3 的受質。而 PARP 其原本作用為修復受損的 DNA 調控細胞增殖與死亡的平衡、和維持基因體的穩定性。但當 PARP 受 Caspase 3 裂解 , 會由 116 kDa 被水解成 85 kDa , 進而失去原本的效用。又如 : Caspase 3 裂解 ICAD/DF45 導致其鍵結的 CAD 能脫離 ICAD 的束縛 , 進而 CAD 可轉移到細胞核內分解 DNA , 將 DNA 切成大約 180-200 bp 長度的片斷。然而 , 上述三大類的 Caspase 均具有一些共同的特徵【78】: 原本為單一無活性的 precursor proenzyme , 活化後被切割形成大、小次單位 , 而形成四聚體模式 , 如 : Caspase 8 其活化態為(P20/P10)₂ , 其切割蛋白質的作用位置則是 Asp 之 C-端的? 鍵 ; 具有自身催化或相互激活的能力 ; 具有相似的催化部位(catalytic site) , 包括含有 active site cysteine 殘基的 QACXG sequence。

五、細胞凋亡時的分子機轉

(一) 造成細胞凋亡的因素

能造成細胞凋亡的原因有許多種，其中包括放射線、高溫、具有毒性的抗癌藥物、自由基的傷害以及特殊抗體，例如能與 APO-1/FAS 抗原結合之抗體等等。

(二) 細胞凋亡的基因調節

細胞凋亡的過程受到許多基因的調控，分別敘述如下：

a、p53 基因

p53 基因是一種腫瘤抑制基因，其所轉錄的蛋白 p53 則是一種能夠抑制腫瘤的蛋白。當細胞的 DNA 在 G1/S 時期發生損傷時，p53 會促使其下游基因的表現，如 WAF1。而 WAF1 的蛋白質產物 p21 會使細胞週期停留在 G1/S 期，直至 DNA 修復後才進入正常的週期【79】。但是當 DNA 受損太嚴重時，p53 則會促使細胞進入細胞凋亡。

b、Bcl 家族

Bcl 家族包括 Bcl-2、Bax、Bcl-xL、Bad 等，是一個與細胞凋亡有關的基因家族【80】。Bcl-2 與 Bcl-xL 可以阻止細胞凋亡，造成腫瘤的發生【81】【82】。而 Bad、Bak、Bax 和 Bcl-Xs 則可以引發細胞凋亡【83、84】。在正常情況下這兩類蛋白質之間維持一定的比率以調節細胞狀態【85】，當 Bcl-2 的表現量高於 Bax 時，便會阻礙細胞凋亡的發生；相反的，若是 Bax 表現量大於 Bcl-2 時，細胞便進入凋亡狀態。

c、c-myc

c-myc 是一種原致癌因子(proto-oncogene) , 屬於 myc 家族中的一員【86~88】。它是一種轉錄因子, 可與 Max 結合形成 heterodimer, 來調節下游基因的表現。直到目前為止, c-myc 與細胞凋亡之間的關係還不是很清楚。

d、APO-1/FAS

FAS 基因所轉錄的蛋白是一種跨膜蛋白, 在許多正常細胞或腫瘤細胞表面都可以發現到它的存在【89~91】。當 APO-1/FAS 與一些細胞激素或是抗體結合時, 便會引發細胞的 apoptosis。

第三章 材料與方法

圖 3-1 為實驗設計與流程總圖，詳細的材料與方法，在以下各節分述。

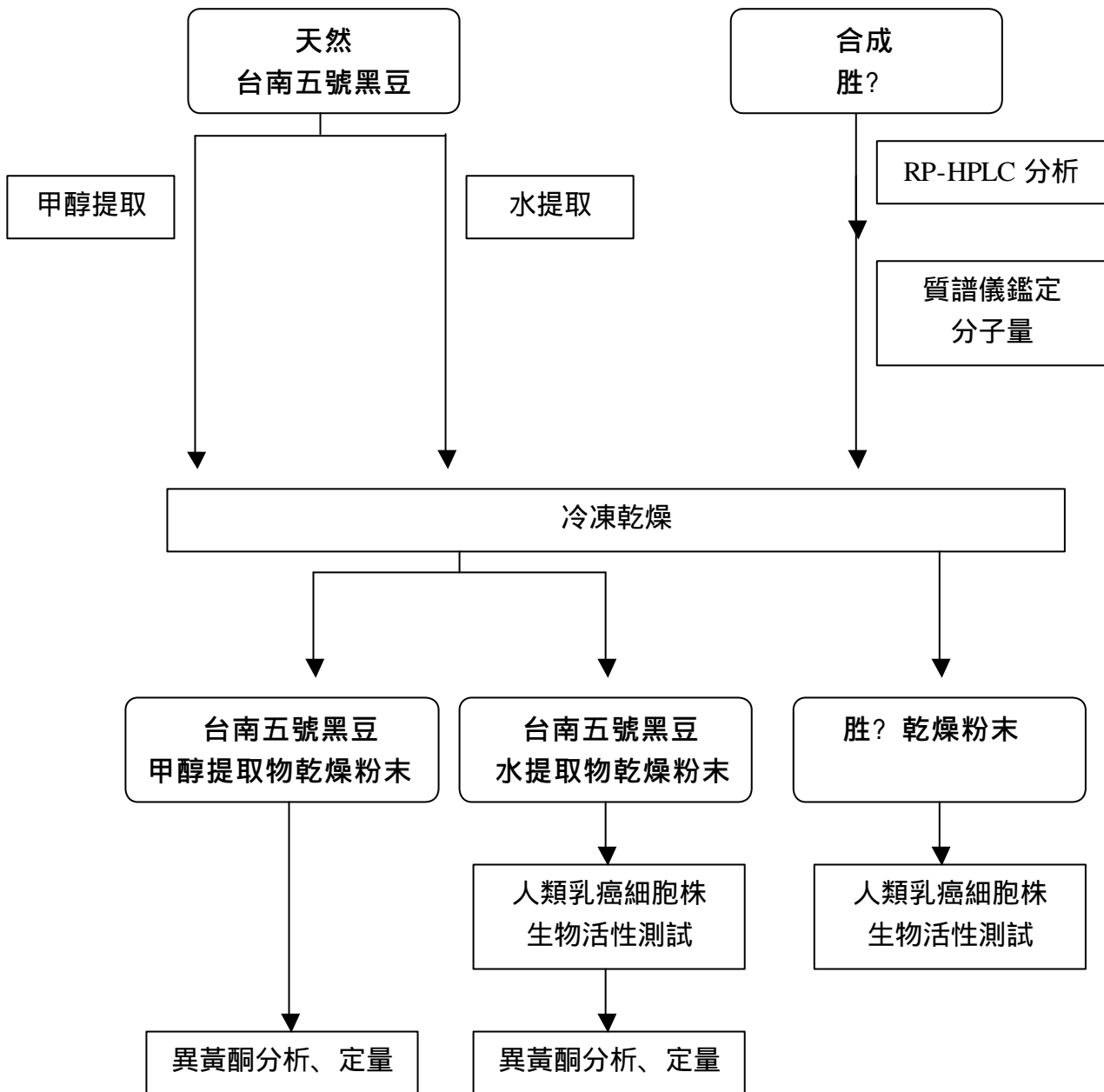


圖 3-1、實驗設計與流程總圖

第一節 人類雌激素依賴型乳癌細胞株之培養

一、藥品及試劑

MEM Medium , Fetal Bovine serum, Penicillin-Streptomycin, L-glutamine 皆購自 GIBCO ; Dimethyl Sulfoxide, Trypan blue, PI (Propidium iodide) 皆購自 Sigma ; Ethanol 購自 TEDIA ; 人類雌激素依賴型乳癌細胞株 (human estrogen-responsive breast cancer cells, MCF-7) 購自新竹食品工業研究院。

二、儀器用具

無菌操作台購自 Lian Shen ; 細胞培養箱購自 Nuaire。細胞培養皿、細胞培養盤購自 FALCON ; 細胞計數器 (Hemocytometer)購自 Boeco ; 倒立式位相差顯微鏡 (phase-contrast microscope)購自 Olympus ; 冷凍管、Dispensor 購自 TPP ; 離心機購自 Beckman ; 微量離心管購自季昺 ; Pipetment 購自 Costar ; 去離子水製造機購自 Minipore ; 流式細胞儀 (Flow cytometry)購自 Becton Dickinson。

三、人類乳癌細胞株(MCF-7)培養

將 MCF-7 細胞株自液態氮桶內取出，迅速置於 37 °C 水浴中解凍。在 4 °C 下，以 4,000 rpm 離心 20 秒，小心吸掉含 DMSO 的上層培養液。細胞株培養在 75T (75 cm²) 型培養角瓶中，一個培養皿內給予 10 mL 培養液，內含 5%胎牛血清(fetal bovin serum, FBS) 的 Minimum Essential Medium (MEM) 培養液，每毫升 MEM 培養液添加 100 IU 青黴素(penicillin)、100 mg 鏈黴素

(streptomycin)、2 mM 麩胺酸(L-glutamine)。將培養皿置於 37 °C 細胞培養箱 (含 5% CO₂) 中培養。細胞培養 3~4 天左右，細胞已佔滿生長平面空間，約 1×10⁶ 個細胞時進行細胞繼代培養：將培養液吸掉，加入 10 mL PBS 緩衝液洗細胞表面，再將 PBS 儘量完全吸掉。加入 1 mL 細胞解離液(Trypsin solution) 簡稱 TEG：包含 0.05 mM 胰蛋白 (trypsin)、2.5 mM 乙二胺四乙酸 (ethylenediaminetetraacetic acid, 簡稱 EDTA)、2.8 mM 葡萄糖(glucose)的混合液。TEG 加入量以能覆蓋細胞表面為原則，而後置入 37 °C 細胞培養箱數分鐘，單層細胞會從培養角瓶面脫落。之後加入 3 mL 培養液沖洗下細胞，在 4 °C 下，以 1500 rpm 離心 5 分鐘。倒掉上層液，再將細胞懸浮移至內含 10mL 培養液的 75T 型培養角瓶，置於 37 °C 細胞培養箱。

第二節 評估黑豆對人類雌激素依賴型乳癌細胞 (MCF-7) 之影響

一、黑豆品種及來源

黑豆品種為台南五號黃仁黑豆，母本來自屏東選黑豆地方種，父本為潮州選黑豆地方種，由台灣省台南區農業改良場採混合法育成【19】。

二、台南五號黑豆水提取物之製備

仿照傳統豆漿製作方法之黑豆水提取物的製備流程，首先取300g黑豆洗淨加入300 mL水泡2小時，再以600 mL去離子水一同加入果汁機打成漿，之後以紗布過濾除去渣籽，再添加1800 mL去離子水煮開，沸騰兩分鐘後立即以冰浴冷卻，得到豆漿。將豆漿置於-80 待凝固後進行冷凍乾燥，得到豆漿粉末，進行人類雌激素依賴型乳癌細胞 (MCF-7) 體外(in vitro)試驗、異黃酮含量分析及蛋白質定量。

三、異黃酮檢量線之建立

利用 RP-HPLC 建立數種異黃酮標準品之檢量線圖。使用之分析管柱為 BDS HYPERSIL C18 (Dim (mm) 250×4.6, Particle size 5 μm), A 液: D.I. H₂O 經 H₂SO₄ 調至 pH 2.7, 再以 Whatman® filter (diameter 47 mm, pore size 0.2 μm), B 液: 乙? (acetonitrile), 流速為 1mL/min, 波長為 254 nm, 沖提之條件如下表 3-1。

表 3-1、RP-HPLC 儀器所設定之沖提之條件

時間 (min)	B 液 (%)
0~35	20-37
35~45	37-100
45~50	100
50~51	20
51~61	20

四、台南五號黑豆水提取物及甲醇提取物之異黃酮種類分析及定量

(一) 黑豆水提取物之製備

黑豆水提取物之製備流程參見第三章材料與方法第二節之二。

(二) 黑豆甲醇提取物之製備

黑豆甲醇提取物之製備流程如圖 3-2。以電子秤稱取經研鉢研磨後的樣品粉末，並記錄克數。將稱量好的樣品粉末倒入圓底燒瓶中並加入 80%，pH 值為 3 的 methanol 75 mL。將圓底燒瓶上接一冷凝管，置於電熱包中，此步驟即完成熱回流裝置。將電熱包開關開啟，定溫於 70℃，加熱沸騰 15 分鐘(以冷凝管滴下第一滴液體為計時起點)。以 3 mL 80% methanol 沖洗冷凝管，並將洗液合併圓底燒瓶中的液體，以抽氣過濾置，趁熱過濾。將上述步驟所得的液體倒入試管中，並以石蠟紙密封管口，石臘紙上應刺洞使水氣能夠逸散，將試管放置於冰箱中，進行冷凍乾燥，得粉末狀樣品。

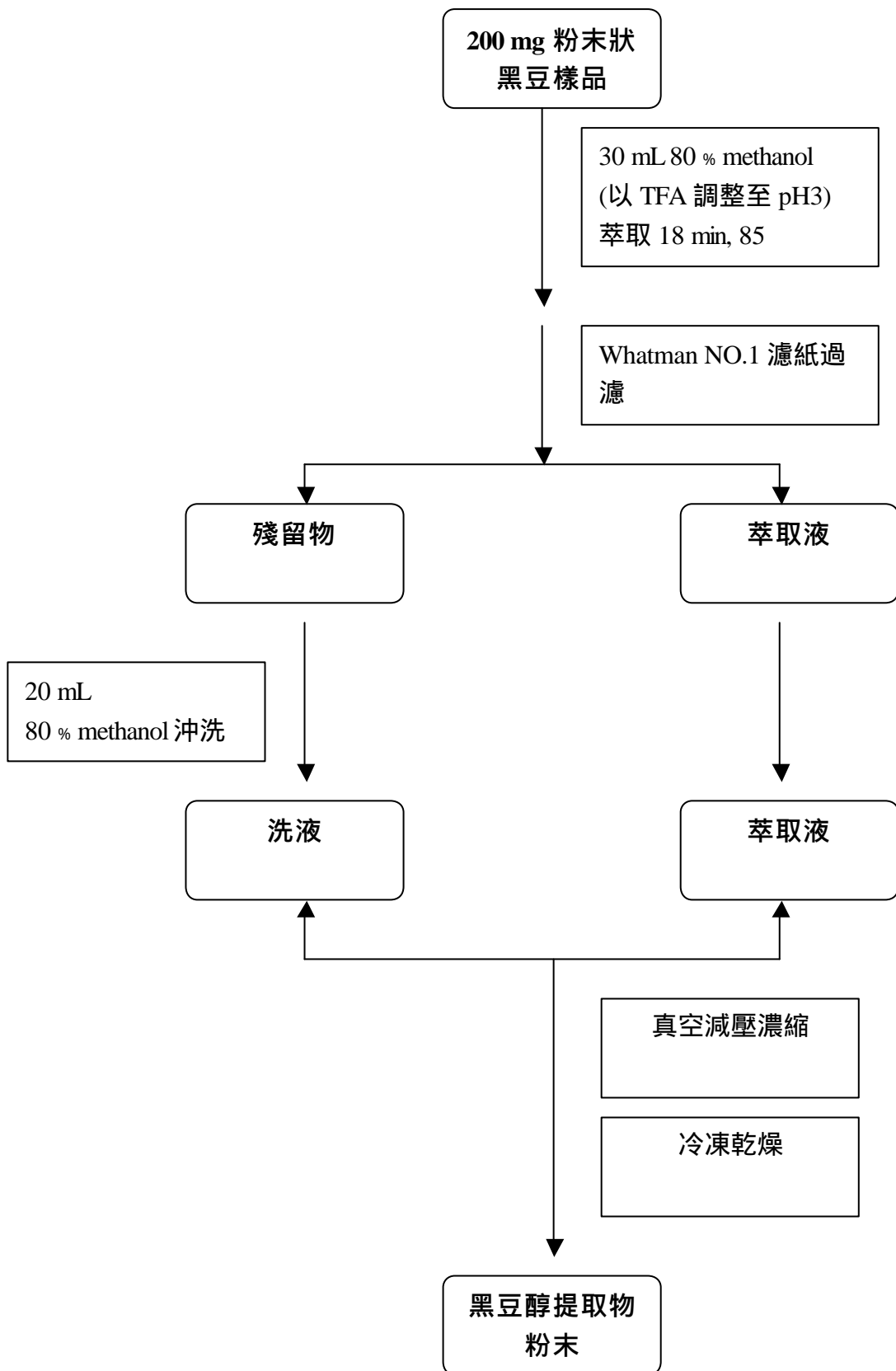


圖 3-2、黑豆甲醇提取物的製備流程

(三) 黑豆水提取物及甲醇提取物之異黃酮含量分析與計算

本方法為分析異黃酮種類及含量，係將樣品注入液相層析儀，以 RP-C18 逆相層柱管柱分析，流洗出來之化合物以紫外光偵測器偵測之，必要時須經稀釋再行檢測。根據所建立的異黃酮標準品檢量線，可得一元二次方程式公式；將樣品波峰面積與標準品比較，並代入公式，計算可得樣品異黃酮種類及含量。

五、序列濃度之黑豆水提取物對人類雌激素依賴型乳癌細胞株存活率之影響

人類乳癌細胞 MCF-7 放入 75 cm² 培養瓶，內含 MEM 培養基、15% 牛血清及 2% penicillin-streptomycin (10000 U/mL penicillin 與 10 mg/mL streptomycin 混和液)，培養於培養箱 37 °C、5% CO₂ 條件下，待乳癌細胞培養至一定數量，便計數分盤。trypan blue 染色來檢測細胞(活的和死亡的)，活細胞是透明無色，死細胞呈淡藍色(trypan blue 會進入該細胞)，利用血球計數皿由 400 倍在光學顯微鏡下計數以進行癌細胞存活率檢測；各取 5×10⁵ 個 MCF-7 細胞 cells 放入 12 孔平盤 (12-well plate) 中培養 24 小時，待細胞貼附完全。秤取黑豆漿粉末 1 g 加入 40 mL 去離子水，並震盪混合均勻，在貼附有 MCF-7 平盤中，分別有無加入序列濃度的黑豆水提取物 (0、0.15、0.31、0.62、1.25 及 2.50 mg/mL)，經過不同時間培養(12、24、48 及 72 小時)後，以 1500 rpm、5 分鐘離心收集細胞。倒掉上清液，打散細胞後加入 2 mL/wells 的 PBS 緩衝液，離心(1500 rpm、5 分鐘)，再利用流式細胞儀 (Flow cytometry; FACS) 計數存活的細胞數，其原理為：無論細胞是進行細胞壞死 (Necrosis) 或細胞凋亡 (Apoptosis) 的路徑，只要細胞死亡，其細胞膜就會失去完整性 (membrane integrity)。而 Propidium iodine (PI) 是一個核酸染劑，進行 PI 染色時，若細

胞死亡，細胞膜破裂，PI 會進入細胞內和核酸結合。若細胞存活，細胞膜完整，PI 則無法和細胞內的核酸結合。PI 染色完成的細胞經由流式細胞儀 488 nm 的雷射光激發後，若死亡的細胞會有較高的紅色螢光，而存活的細胞則有較弱的紅色螢光。再用 CellQuest[®] 軟體分析存活細胞數和存活率。

六、序列濃度之黑豆水提取物對人類雌激素依賴型乳癌細胞株細胞週期之影響

序列濃度之台南五號黑豆水提取物 (0、0.15、0.31、0.62、1.25 及 2.50 mg/mL) 加入於 6 孔洞平盤 (6-well plate) 中，每孔含有貼附的 MCF-7 細胞約 5×10^5 個，於 37 °C、5 % CO₂ 的培養箱進行培養。經 24、48 及 72 小時後以流式細胞儀檢測細胞週期變化情形。

將細胞懸浮液分別移到 15 mL 離心管中離心(1500 rpm、5 分鐘)。倒掉上清液，打散細胞後加入 2 mL/wells 的 PBS 緩衝液，離心(1500 rpm、5 分鐘)。倒掉上清液，將細胞完全打散後，以 4 °C 冰的 70%酒精進行細胞固定步驟，隨後將細胞固定步驟完成的樣品置於 -20 °C 冰箱隔夜存放。隔天，將樣品從冰箱取出後離心(1500 rpm 5 分鐘)以去除酒精，之後將細胞完全打散。加入 2 mL 的 PBS 緩衝液清洗一次後將細胞完全打散。最後在每個試管中加入 400 μ L 的 PI 染劑(其量可視細胞數目增減)，於避光條件下反應 30 分鐘。等待的時間可準備 FACS 專用管，檢查 FACS 專用管是否破損後，於管子外標上樣品編號備用。以 1 mL pipette 在 15 mL 離心管中抽吸數次後，將細胞移到 FACS 專用管後避光置於冰上。最後以流式細胞儀進行樣品分析，儀器分析時，每秒細胞數不宜超過 300 顆細胞，每個數據收集 10000 顆細胞，數據以 Modfit LT[®] 軟體進行處理分析。

七、序列濃度之黑豆水提取物對人類雌激素依賴型乳癌細胞株形態之影響

序列濃度之台南五號黑豆水提取物 (0、0.15、0.31、0.62、1.25 及 2.50 mg/mL) 加入於 6 孔洞平盤中，每孔含有貼附的 MCF-7 細胞約 5×10^5 個，於 37 °C、5% CO₂ 的培養箱進行培養。經 48 小時培養後，於倒立式位像差顯微鏡下照相。

八、台南五號黑豆之蛋白質定量

西元 1883 年 Johan Kjeldahl 建立了一套檢測有機物中-3 價氮的方法，即測定氮的含量的方法，即粗蛋白質的定量 (kjeldahl method 凱式定量法)。自蛋白質被確定是由含氮的氨基酸組成的高分子物質後，這一方法被廣泛用於食品中蛋白質含量的測定。首先測定食物中氮的百分含量，然後按一定的係數換算為相應的蛋白質的量。

(一) 藥品

粗蛋白質的定量使用的試藥包括 Saturated NaOH solution, Hydrogen peroxide, Methyl red indicator, Concentrated H₂SO₄, Copper sulfate, Potassium sulfate, 0.05N Sulfuric acid, 0.05N Sodium hydroxide。

(二) 器材

粗蛋白質的定量所使用之器材有電熱包、快速定氮分餾裝置、凱式分解瓶、100 mL 定量瓶、三角瓶、滴定裝置、沸石等。

(三) 步驟

樣品先浸泡在高濃度的硫酸中，加入一些催化劑和鹽類。混合物以攝氏

325 到 375 度反應，將有機氮轉成無機氮。再藉著和鹼類的蒸餾反應，會將鉍態氮變成氨。再用硼酸溶液收集氨，便可算出氮的含量，由此可推得粗蛋白含量。

第三節 評估合成胜？對人類雌激素依賴型乳癌細胞之影響

一、線狀胜？(Linear peptide)之合成

(一) 藥品

Pal resin, Fmoc derivatives of standard amino acids : Side-chain protections are as follows Gln(Trt), Glu(OtBu), Arg(Pbf), Asp(OtBu), Thr(tBu), Lys(Boc), His(Trt), Asn(Trt)、HBTU (O-Benzotriazol-1-yl-N,N,N',N'-tetramethyluronium Hexafluorophosphate) / HOBt (1-hydroxybenzotriazole) 購自 Advanced Chemistry Inc.; Piperidine, Trifluoroacetic acid (TFA)購自 Lancaster ; N,N-Diisopropylethamine (DIEA), Ethanedithionl (EDT)購自 SIGMA ; DMF (N , N - d i m e t h y l f o r m a m i d e) , DCM (Dichloromethane)購自 Mallinckrodt。

(二) 儀器

preparative C18-RP-HPLC columns , 冷凍乾燥機(Freeze Dryer), 高效能液相層色分析儀(HPLC)等。

(三) 進行步驟

應用固相胜？合成法(solid phase peptide synthesis , SPPS)中 Fmoc/tBu

chemistry 之合成方法【92】，將第一個支鏈保護(side-chain protected)的 Fmoc-amino acid (4 equivalent)利用偶合劑(4 equivalent of HBTU + 4 equivalent of HOBt + 4 equivalent of DIEA)結合至 PAL resin (1 equivalent)上，再將結合至 PAL-amide resin 之第一個支鏈保護(side-chain protected)的 Fmoc-amino acid 的 N 端 Fmoc 保護基利用去保護基試劑 (20% piperidine in DMF)除去，重複上述之結合反應及去 Fmoc 保護基反應將其餘每一個支鏈保護 (side-chain protected)之 Fmoc-amino acid 依序結合至 resin 上，得到 $aa^1-aa^2-aa^3-----aa^n$ -PAL resin, n 代表胜? 中胺基酸 (aa, amino acid)之位置。最後利用裂解劑 (95%TFA) 將 $aa^1-aa^2-aa^3-----aa^n$ 與 PAL resin 裂解分離 (圖 3-3)，合成好的胜? 再利用冰乙醚將殘餘的 TFA 去除乾淨，盡量避免 TFA 的殘留，降低其對胜? 的裂解傷害。胜? 混合液用氮氣(N₂)吹去後呈黏稠狀，加 2 mL 的去離子水，冰凍後即作冷凍乾燥。乾燥後的粉末即是胜? 粗產物，需要進一步 RP-HPLC 純化。

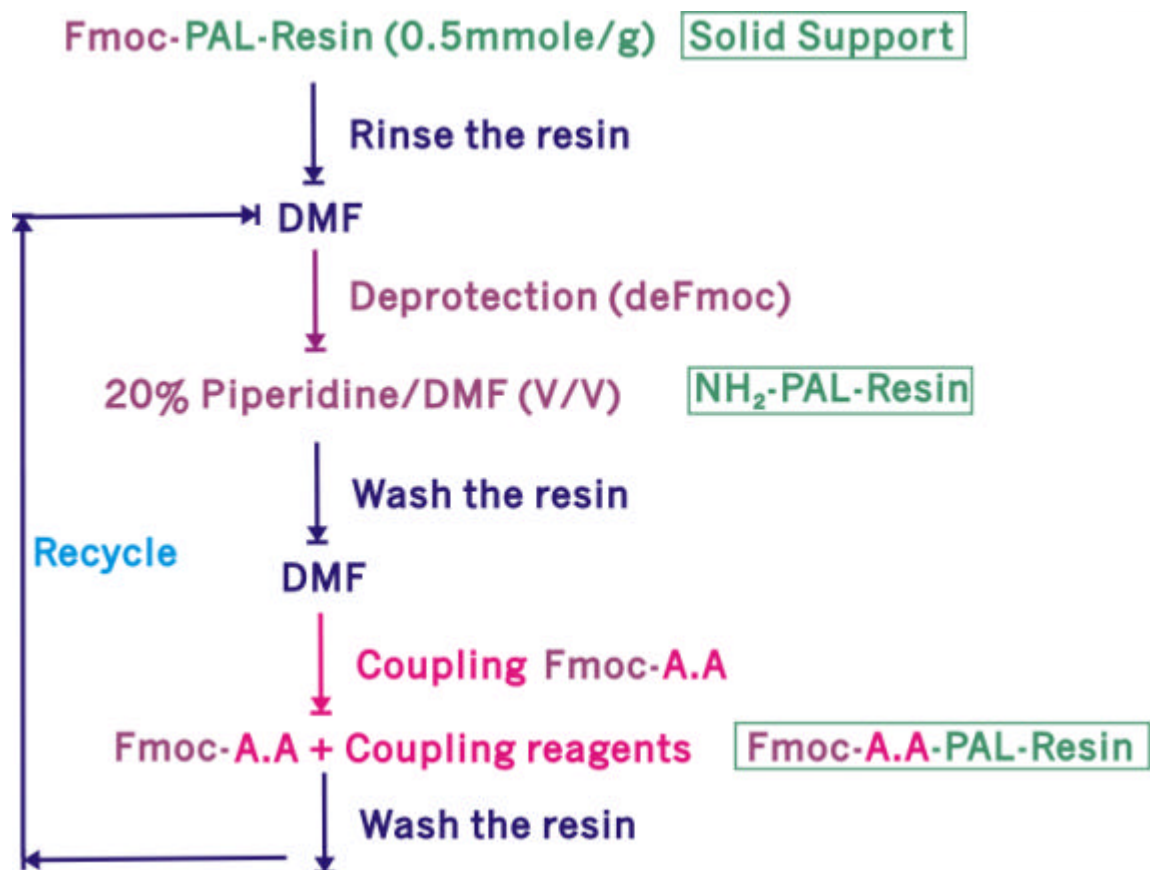


圖 3-3、固相胜？合成流程圖

本實驗以 PAL resin 當作固相支持物 (Solid support), 先以 20% piperidine/DMF、30 分鐘, 將樹脂 N-端保護基 (Fmoc 基) 去除, 再將含有保護基的胺基酸以偶合劑 (HOBt、HBTU、DIEA 需 2~4 倍過量) 接上樹脂 N 端; 第二個胺基酸連接之前, 也是要先將已在樹脂上之第一個胺基酸的 N 端保護基用 20% piperidine/DMF、30 分鐘除去, 才能以偶合劑將第二個胺基酸的 C-端 與露出 N-端的前一個胺基酸形成 Peptide bond 而連結。最後以 95%TFA 反應 1.5 小時可將合成的胜？鏈從樹脂上切下。

二、逆相高效能液相層析分析儀 (reverse phase high performance liquid chromatography, RP-HPLC)分析、純化合成之胜?

高效能液相層析法之發展始於 1964-65 年間，為樣品中各成分在不互溶之兩相間以物理方法加以分離。欲分離的樣品，首先溶解於適當的溶劑中，注射入所選擇的層柱(Column)再以高壓輸入移動相，由於為移動相與固定相之間的配比係數(Partition Coefficient)不同，樣品中因為固定相中各成分停留時間不一，得以分離；樣品中成分經 UV 光源 225 nm 偵測後之值表現於積分儀的圖上。

(一) HPLC 材料

Trifluoroacetic acid 購自 Lancaster；Acetonitrile 購自 TEDIA；RP-HPLC column 型號為 LichroCART 250-10, cat. 1.50853, RP-C18 (10 μ m); 0.45 μ m filter 購自 MSI。

(二) HPLC 溶劑

1. **Solution 1** : 4L D.I. Water + 0.05% Trifluoroacetic acid (TFA)
2. **Solution 2** : 4L Acetonitrile + 0.05% Trifluoroacetic acid (TFA)

移動相流速 4 mL/min

表 3-2、RP-HPLC 純化胜? 移動相分配比例

時間	Solution 1	Solution 2
0 min	90%	10%
30 min	10%	90%
35 min	10%	90%
40 min	90%	10%
48 min	90%	10%

(三) HPLC 方法步驟

- 1.欲分析或純化的樣品應以孔徑 0.2 μm 針筒過濾器(filter)過濾，濾液注射至儀器前，須先去除儀器微流管柱內及移動相氣泡(Purge)。
- 2.樣品注射前，先讓儀器空跑，確認管柱內沒有殘存的干擾物。若有雜訊出現，應設定適當條件(流速、溶劑配比係數)將管柱清洗乾淨後，再行樣品分析。
- 3.樣品注入樣品注射閥，此時樣品仍停留於閥內，注射閥箭頭停留在 lode 位置；待 RP-HPLC 儀與積分儀的同步化操作完成，將閥往下推至 inject，樣品就進入 RP-C18 管柱進行層析。
- 4.積分儀隨著樣品成分於不同時間出現面積大小不一的波峰 (peak)，此時若要進行純化可依積分儀出現的波峰，個別收集每個波峰出現時 RP-HPLC 儀所層析出的液體，經冷凍乾燥，使得純的乾燥粉末。

三、快速原子撞擊質譜儀之胜? 分子量鑑定(fast atom bombardment mass sepectrophotometry, FAB-MS)

質譜儀分析時樣品必須先進行離子化，因樣品其物理、化學性質不同，而有各種不同離子化的方式。易揮發性樣品用電子撞擊游離法(Electron impact ionization, EI)，或用化學游離法(Chemical ionization, CI)。非揮發性樣品用快速原子撞擊(Fast atom bombardment, FAB)，或電灑法(Electrospray ionization, ESI)等。因此各種樣品選擇適當的離子法，再經質譜分析。

本實驗純化後之胜? 產物是以 FAB-MS 質譜儀分析鑑定其分子量，確定其正確組成後再近一步探討其反應機制。

四、表面漿體共振 (Surface Plasmon Resonance, SPR)技術篩選具有 Grb2 SH2 親和力之胜?

(一) 實驗儀器

BIAcore 購自 biacore AB, Pharmacia Inc., Sweden。

(二) 實驗材料

sensor chip CM5, HBS buffer (0.01 M HEPES, 0.15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0.005% polysorbate 20(v/v pH 7.4) , 以及 amine coupling kit : NHS (N-hydroxysuccinimide) , EDC (1-ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl) carbodiimide 及 Ethanolamine hydrochloride pH 8.5 皆購自 biacore AB, Pharmacia Inc., Sweden。

(三) 實驗方法

感應晶片在固定鍵合物之前，須將感應晶片表面的 carboxymethyl dextran 活化，本實驗所固定的鍵合物為 Grb2 SH2，分析物為自行合成純化之六種胜？，分別是 Fomc-Glu-Tyr-Ach-Asn-NH₂、NH₂-Glu-Tyr-Ach-Asn-NH₂、Fmoc-Glu-Tyr-Aib-Asn-NH₂、Fmoc-Aad-Tyr-Aib-Asn-NH₂、Fmoc-Gla-Tyr-Aib-Asn-CONH₂ 及 Fomc-Ala-Tyr-Aib-Asn-CONH₂，Shc(PY) 為已知對 Grb2 SH2 有相當高之親和性的標準品，在此實驗中可當作一對照組。

A. 感應晶片之製備

(a) 感應晶片的活化

所使用之感應晶片為 CM5，在進行晶片的活化之前，必須讓儀器處於一個穩定的狀況下，其中包括溫度須在 25 以及須讓感應晶片有一段時間穩

定，其 RU 的變化穩定下才能進行活化，再利用電腦軟體系統選擇 amine coupling 的模式下進行生物感應晶片之活化，以 HBS buffer 通過微射流系統之流速為 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ ，之後注入 35 μL NHS 0.05M/ EDC 0.2M (50 : 50, v/v)，進行感應晶片表面 carboxymethylated dextran 之活化。

(b) 感應晶片表面鍵合物之固定

將欲固定於感應晶片表面的 Grb2 SH2 取 70 μL (注入之體積設定於 50 μL) 溶於 10 mM sodium acetate buffer , pH4.5 後，在晶片活化後 3 分鐘內注入至微射流系統中。

(c) 感應晶片之去活化

取 55 μL (注入之體積設定於 35 μL) 0.1 M Ethanolamine hydrochloride 注入微射流系統中，將感應晶片中未和 Grb2 SH2 結合之 COOH 官能基覆蓋住，即完成了去活化。此時要讓晶片以 HBS buffer 通過微射流系統，使其 RU 值穩定，將穩定後之 RU 值扣除未進行活化前之 RU 值。

B. 檢測流程

(a.) 儀器之設定

在進行實驗之前一天須先以固定有 Grb2 SH2 晶片放入儀器中，以 HBS buffer 通過微射流系統中且溫度在 25 $^{\circ}\text{C}$ 下至隔夜，流速設定在 1 $\mu\text{L}/\text{min}$ ，使儀器內部呈現穩定的平衡狀態。隔日，進行實驗的前一個小時將流速調至 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ 後，注入 70 μL 的緩衝溶液 (HBS buffer) 觀察其 RU 的變化，直到注入之緩衝液不會造成感應分析圖 RU 的變化後，表示儀器對系統中固定流速的緩衝液與注入的緩衝液不會造成 RU 的變化，即可進行實驗。

(b.) 胜? 分析物的製備

將經純化的六種胜? (圖 2-4) 粉末配成 0.7500 mM、0.5000 mM、0.3750 mM、0.2500 mM、0.1875 mM、0.1250 mM 溶於 HBS buffer 中，注入以固定有 Grb2 SH2 的感應晶片上，每一個樣品以注入之體積為 70 μ L (設定於 50 μ L)，流速設定為 5 μ L/min 後進行分析，當樣品注入後 RU 值會上升，當 10 分鐘後樣品注射完畢後利用高速的緩衝液沖洗微射流系統後，非專一性的物質便會被沖洗下來，當其感應圖上之 RU 值回到未注入樣品前的值時，便可以進行下一個樣品的分析。

(c.) 平衡反應的測量 (測定反應親和力與焓)

親和力通常用結合常數 (K_a) 或解離常數 (K_d) 表示。將序列稀釋的樣品胜? 通過固定有 Grb2 SH2 的晶片後，經 BIA evaluation software 分析計算，可以得到反應的結合常數或解離常數。

五、評估合成胜？對人類雌激素依賴型乳癌細胞株存活率之影響

進行人類乳癌細胞細胞株 (MCF-7) 體外細胞培養，並探討以生物感測器的方法所篩選出的合成胜？對乳癌細胞生長之影響。秤取 Fmoc-Glu-Tyr-Aib-Asn-NH₂ (peptide 3)，並以 DMSO (最終濃度 0.08%) 溶解震盪混合均勻。人類乳癌細胞株 MCF-7 收集之後分盤，以 12 孔洞平盤培養於 37 °C、5% CO₂ 條件下培養 24 小時，待細胞貼附完全再行加藥；經過 48 及 72 小時之有無 peptide 3 處理 (最終濃度為 0、12.5、25.0、37.5、50.0、62.5 μM) 後，利用流式細胞儀評估存活細胞數，經統計後以細胞存活百分率 (%) 表示。

六、評估合成胜？對人類雌激素依賴型乳癌細胞株細胞週期之影響

序列濃度之 peptide 3 (最終濃度為 0、12.5、25.0、37.5、50.0、62.5 μM) 加入於 6 孔洞平盤中，每孔含 MCF-7 細胞約 5×10^5 個，於 37 °C、5% CO₂ 的培養箱進行培養。經過 24 小時後收集細胞並以 4 °C 冰的 70% 酒精進行細胞固定步驟，然後置於 -20 °C 冰箱隔夜存放，加入 PI (包括 0.2 mg/mL PBS PI、5% Triton X-100、RNAase A) 染色，避光條件下反應 30 分鐘，再利用流式細胞儀檢測乳癌細胞其細胞週期分佈情形之改變最後以流式細胞儀進行樣品分析，數據以 Modfit LT[®] 軟體進行處理分析。

第四節 統計分析

數據結果以平均值±標準差(mean±SD)表示，各組與對照組間之數據分析以*paired-t test*進行統計比較。當 $p < 0.05$ 表示在統計學上具有差異。

第四章 結果與討論

第一節 天然食材-台南五號黑豆水提取物對人類雌激素依賴型乳癌細胞之實驗

一、序列濃度之黑豆水提取物對人類雌激素依賴型乳癌細胞株存活率之影響

人類乳癌細胞株 MCF-7 分別經過 12、24、48 及 72 小時之有無台南五號黑豆水提取物（最終濃度為 0、0.15、0.31、0.62、1.25 及 2.50 mg/mL）處理後，利用流式細胞儀評估存活細胞數，經統計後以細胞存活百分率（% cell viability）表示於圖 4-1。由圖 4-1 之結果發現台南五號黑豆水提取物對人類乳癌細胞株 MCF-7 細胞增生具有影響，即伴隨著台南五號黑豆水提取物之濃度及處理時間增加有明顯的抑制細胞增生的效果。MCF-7 細胞經濃度 1.25 mg/mL 的台南五號黑豆水提取物處理 12 小時，與控制組的細胞存活百分率比較，出現顯著差異，控制組此時細胞存活百分率平均為 78%，而經 1.25 mg/mL 的台南五號黑豆水提取物處理 12 小時後，細胞存活百分率平均降為 46%；當以 2.50 mg/mL 的台南五號黑豆水提取物處理 12 小時後，細胞存活百分率平均為 37%，如圖 4-1(A)，隨著台南五號黑豆水提取物濃度增加，其抑制 MCF-7 細胞生長的作用越明顯。圖 4-2 是將各組的控制組 MCF-7 細胞存活率視為 100%，不同濃度、時間處理的實驗組之相對存活率，則以百分比表示之。

分析以 1.25 mg/mL 及 2.50 mg/mL 的台南五號黑豆水提取物處理 24 小時之 MCF-7 細胞後發現，細胞存活百分率平均分別為 24%、19%，如圖 4-1(B)；處理 48 小時後，細胞存活百分率平均分別達到 13%、8%，如圖 4-1(C)；而以 2.50 mg/mL 的台南五號黑豆水提取物處理 72 小時後，其細胞存活百分

率平均降至 4%，如圖 4-1 (D)。處理 12 至 72 小時之細胞，經分析後發現，隨著台南五號黑豆水提取物處理時間的增加，MCF-7 細胞存活百分率逐漸降低。

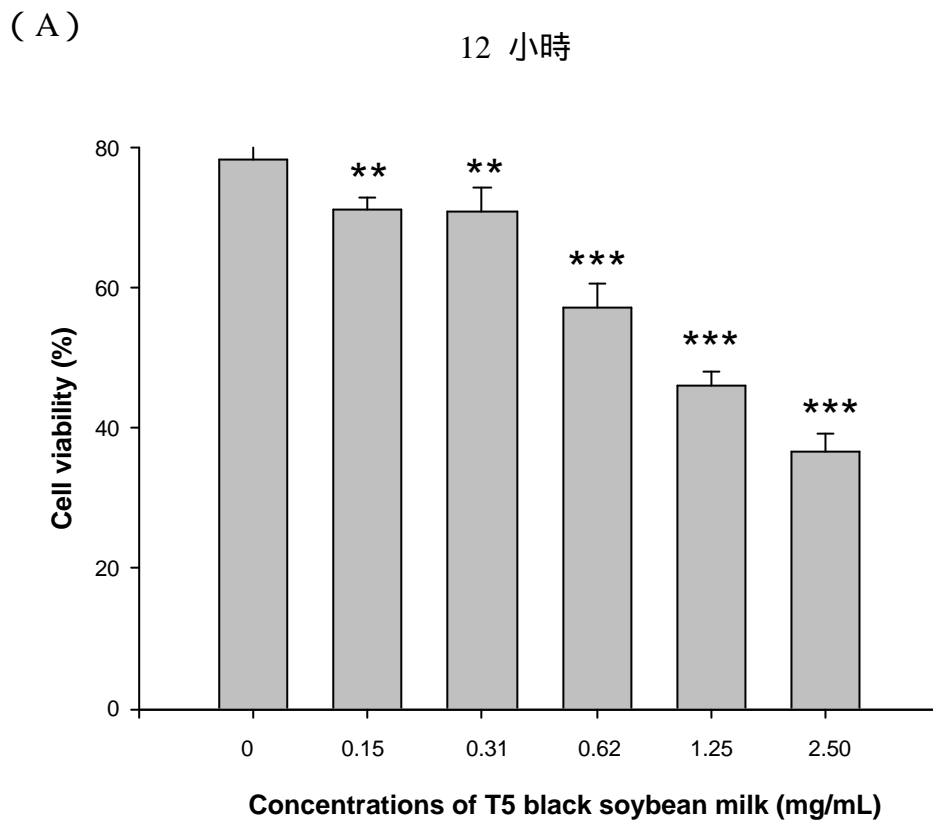


圖 4-1、序列濃度的台南五號黑豆水提取物處理人類乳癌細胞株 MCF-7，12、24、48 及 72 小時之細胞存活率變化的情形。(A) 人類乳癌細胞株 MCF-7，分別經過 12 小時之有無台南五號黑豆水提取物處理（最終濃度為 0、0.15、0.31、0.62、1.25 及 2.50 mg/mL）後，癌細胞存活率（%）之變化。以 sigmaplot 軟體及 student t-test 統計分析，平均值 \pm 標準偏差 (n=3)。*代表 $P < 0.05$ ；**代表 $P < 0.02$ ；***代表 $P < 0.01$ ；****代表 $P < 0.001$ 。

(B)

24 小時

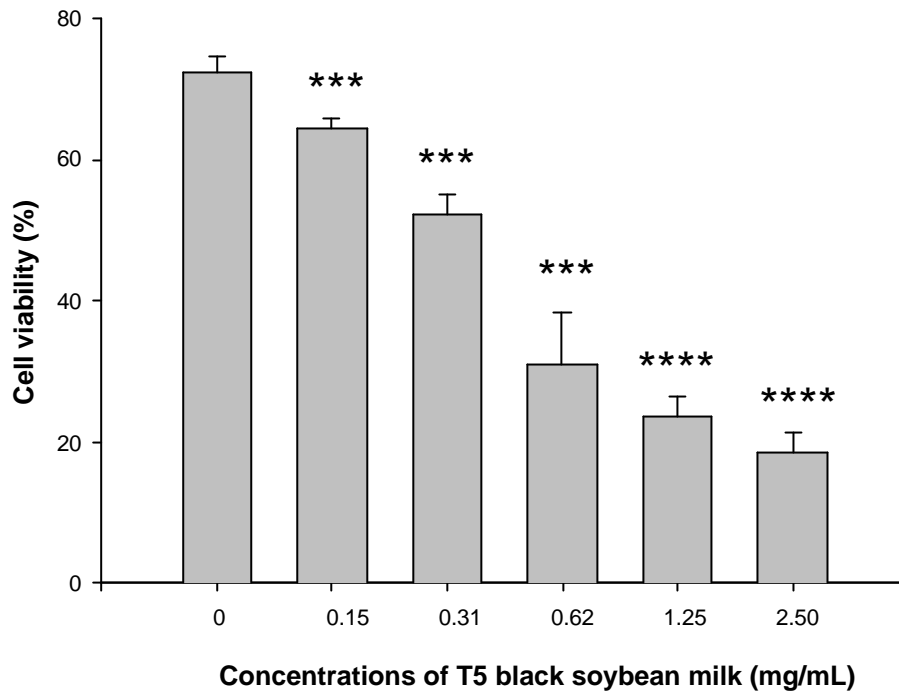


圖 4-1、序列濃度的台南五號黑豆水提取物處理人類乳癌細胞株 MCF-7，12、24、48 及 72 小時之細胞存活率變化的情形。(B) 人類乳癌細胞株 MCF-7，分別經過 24 小時之有無台南五號黑豆水提取物處理 (最終濃度為 0、0.15、0.31、0.62、1.25 及 2.50 mg/mL) 後，癌細胞存活率 (%) 之變化。以 sigmaplot 軟體及 student t-test 統計分析，平均值 \pm 標準偏差 (n=3)。*代表 $P < 0.05$ ；**代表 $P < 0.02$ ；***代表 $P < 0.01$ ；****代表 $P < 0.001$ 。

(C)

48 小時

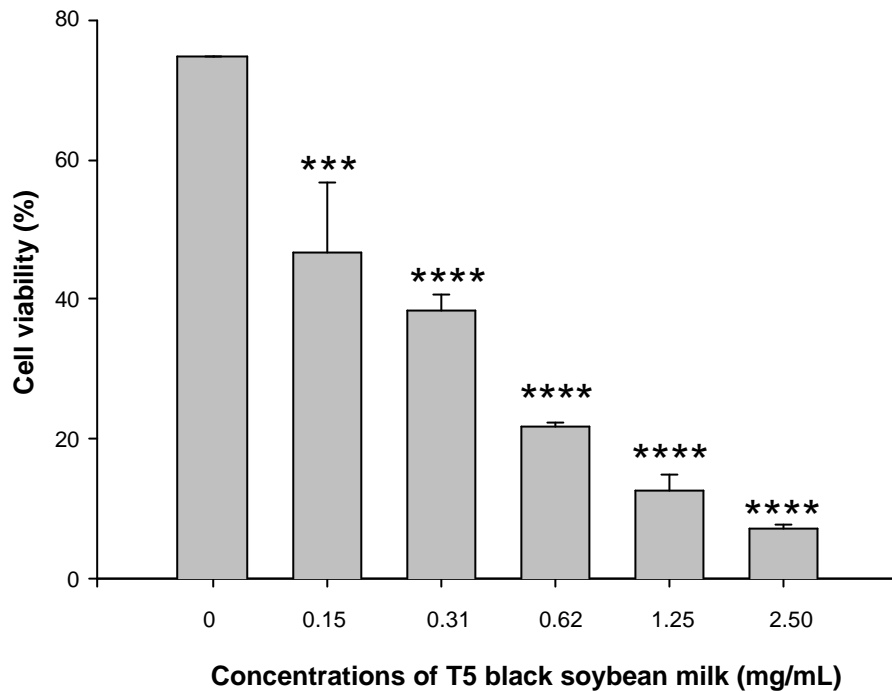


圖 4-1、序列濃度的台南五號黑豆水提取物處理人類乳癌細胞株 MCF-7，12、24、48 及 72 小時之細胞存活率變化的情形。(C) 人類乳癌細胞株 MCF-7，分別經過 48 小時之有無台南五號黑豆水提取物處理（最終濃度為 0、0.15、0.31、0.62、1.25 及 2.50 mg/mL）後，癌細胞存活率（%）之變化。以 sigmaplot 軟體及 student t-test 統計分析，平均值 \pm 標準偏差 (n=3)。*代表 $P < 0.05$ ；**代表 $P < 0.02$ ；***代表 $P < 0.01$ ；****代表 $P < 0.001$ 。

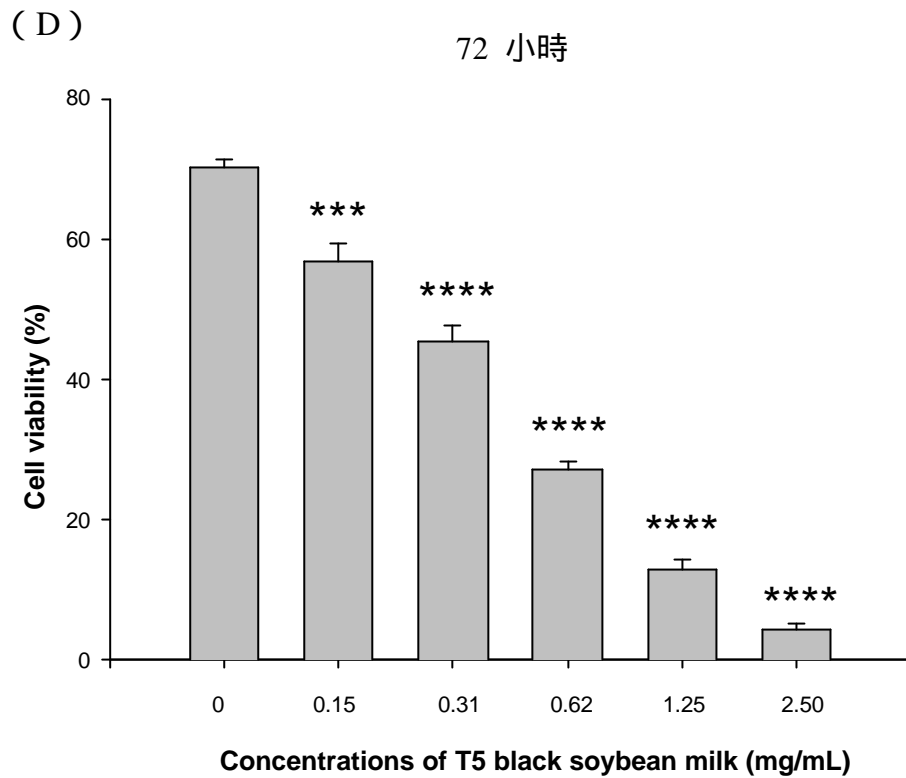


圖 4-1、序列濃度的台南五號黑豆水提取物處理人類乳癌細胞株 MCF-7，12、24、48 及 72 小時之細胞存活率變化的情形。人類乳癌細胞株 MCF-7，分別經過 12 (圖 A)、24 (圖 B)、48 (圖 C) 及 72 (圖 D) 小時之有無台南五號黑豆水提取物處理 (最終濃度為 0、0.15、0.31、0.62、1.25 及 2.50mg/mL) 後，癌細胞存活率 (%) 之變化。以 sigmaplot 軟體及 student t-test 統計分析，平均值 \pm 標準偏差 (n=3)。*代表 $P<0.05$ ；**代表 $P<0.02$ ；***代表 $P<0.01$ ；****代表 $P<0.001$ 。

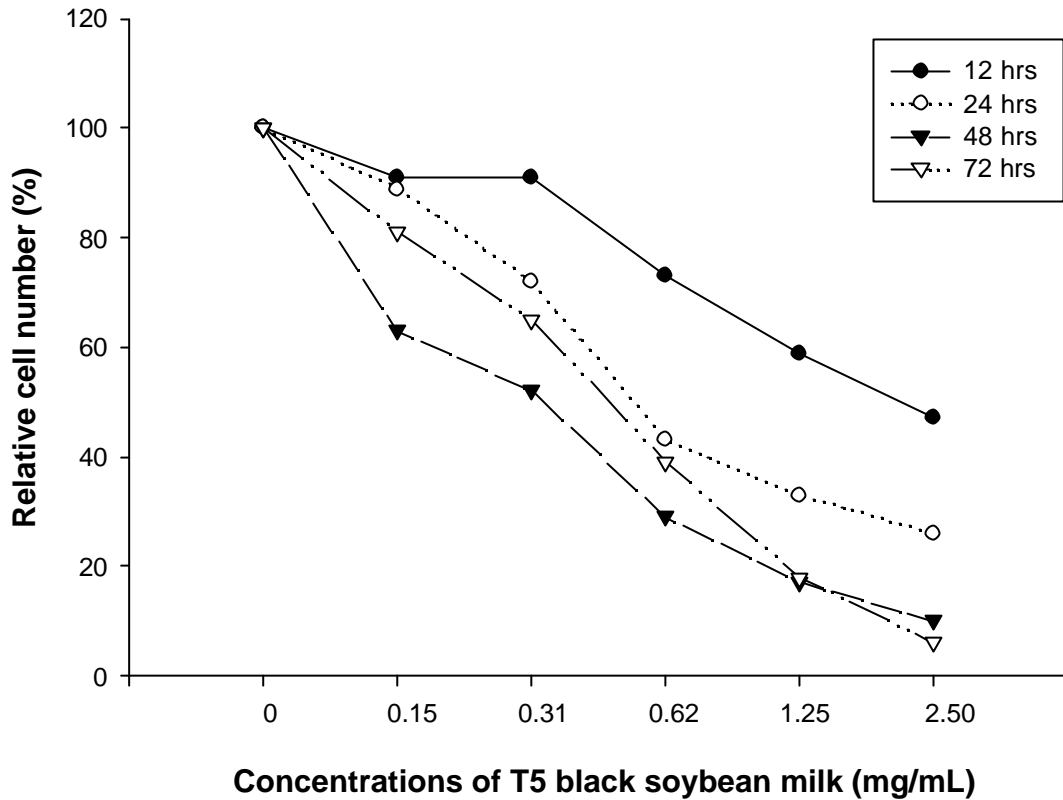


圖4-2、序列濃度的台南五號黑豆水提取物處理人類乳癌細胞株MCF-7，12、24、48及72小時後，細胞存活百分率之變化情形。以對照組存活細胞數目作為100%。利用流式細胞儀評估細胞存活率，以不同濃度之台南五號黑豆水提取物(最終濃度為0、0.25、0.31、0.62、1.25及2.50 mg/mL)處理乳癌細胞12、24、48及72小時後，統計分析細胞增生的變化。

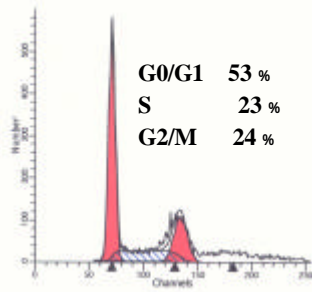
二、序列濃度之黑豆水提取物對人類雌激素依賴型乳癌細胞株細胞週期之影響

(一) 檢測序列濃度之台南五號黑豆水提取物對人類雌激素依賴型乳癌細胞株細胞週期之影響是否呈劑量關係

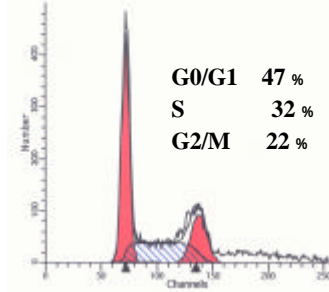
從stock solution(12.5 mg/mL) 的台南五號黑豆水提取物中分別取25、50、100、200、400 μ L/well(其最終濃度分別為0、0.15、0.31、0.62、1.25及2.50 mg/mL) 加入於6孔洞平盤中，每孔含MCF-7約細胞 5×10^5 個，於37 $^{\circ}$ C、5% CO₂的培養箱進行培養。經過24小時、48小時、72小時後利用流式細胞儀檢測乳癌細胞其細胞週期分佈情形的變化。將MCF-7細胞其細胞週期(G₀-G₁、S、G₂-M、apoptosis) 所佔每一個時期以百分比表示，所有的實驗均進行三重複。

圖4-3、4-5、4-7各為序列濃度(0~2.50 mg/mL) 的台南五號黑豆水提取物處理人類雌激素依賴型乳癌細胞株24小時、48小時及72小時之細胞週期變化的情形。經Student's t-test統計結果發現以0.15 mg/mL濃度的台南五號黑豆水提取物處理MCF-7 24小時後，細胞週期於G₀~G₁期的百分比下降，S期上升，G₂~M期則無明顯改變，其他濃度0.31、0.62、1.25及2.50 mg/mL與控制組比較也出現與0.15 mg/mL濃度相同情形，表示台南五號黑豆水提取物在這幾個濃度下，處理24小時，會促使細胞從G₀~G₁期移到S期，但S期並不繼續走向G₂~M期，癌細胞停滯於S期(圖4-4)。2.50 mg/mL台南五號黑豆水提取物處理MCF-7 48小時，細胞週期的apoptosis期佔細胞週期比率的7%(圖4-5、4-6)，經台南五號黑豆水提取物72小時的處理，隨濃度的增加，apoptosis也有顯著增加(圖4-7、4-8)；而以2.50 mg/mL台南五號黑豆水提取物處理72小時，細胞幾乎沒有存活。

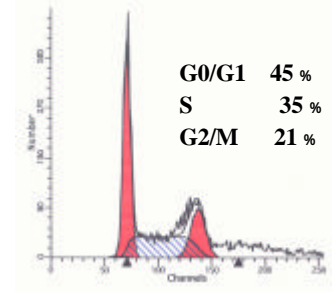
(A) Control



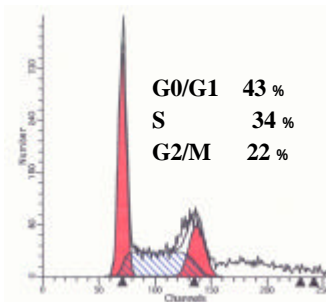
(B) 0.15 mg/mL



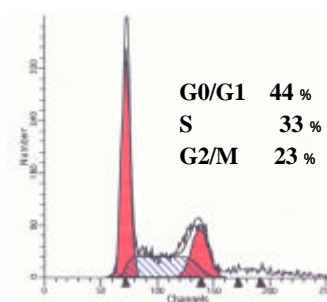
(C) 0.31 mg/mL



(D) 0.62 mg/mL



(E) 1.25 mg/mL



(F) 2.50 mg/mL

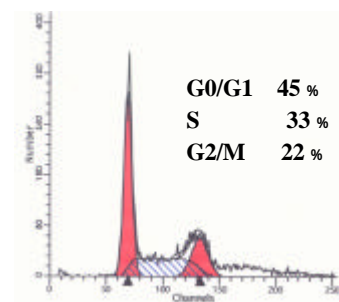


圖 4-3、序列濃度的台南五號黑豆水提取物 (0~2.50 mg/mL) 處理人類雌激素依賴型乳癌細胞株 24 小時後，其細胞週期變化的情形。將 0~2.50 mg/mL 台南五號黑豆水提取物加入人類雌激素依賴型乳癌細胞株 (MCF-7) 中培養 24 小時後，利用流式細胞儀 (Flow cytometry; FACS) 檢測細胞週期變化的情形，數據以 Modfit LT[®] 軟體進行處理分析。(A) ~ (F) 為不同濃度的台南五號黑豆水提取物，其濃度分別如下：(A) 0 mg/mL (B) 0.15 mg/mL (C) 0.31 mg/mL (D) 0.62 mg/mL (E) 1.25 mg/mL (F) 2.50 mg/mL。

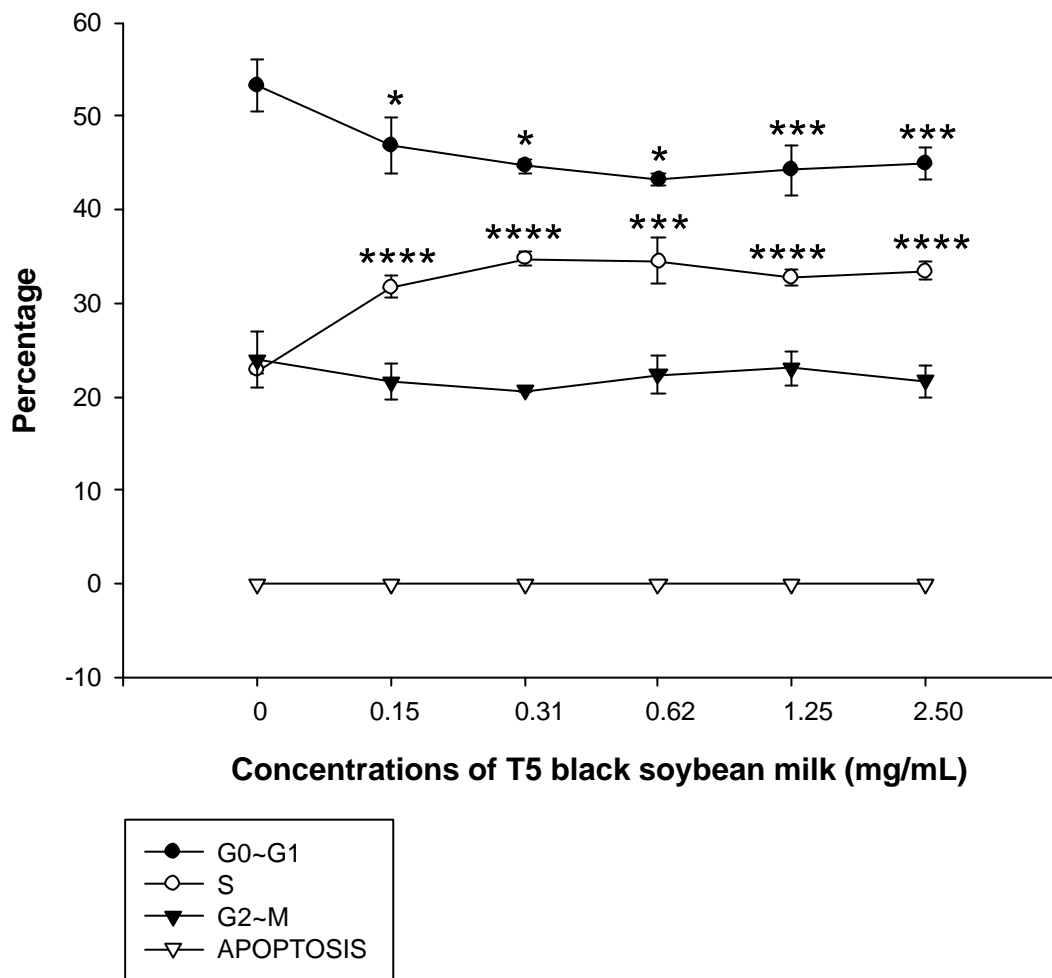


圖 4-4、序列濃度的台南五號黑豆水提取物 (0~2.50 mg/mL) 處理人類雌激素依賴型乳癌細胞株 24 小時後, 其細胞週期變化的統計分析。數據以 SigmaPlot 2000 軟體進行處理分析。數據結果以平均值±標準偏差(mean±SD)表示, n=3。
*代表 P<0.05 ; **代表 P<0.02 ; ***代表 P<0.01 ; ****代表 P<0.001。

。

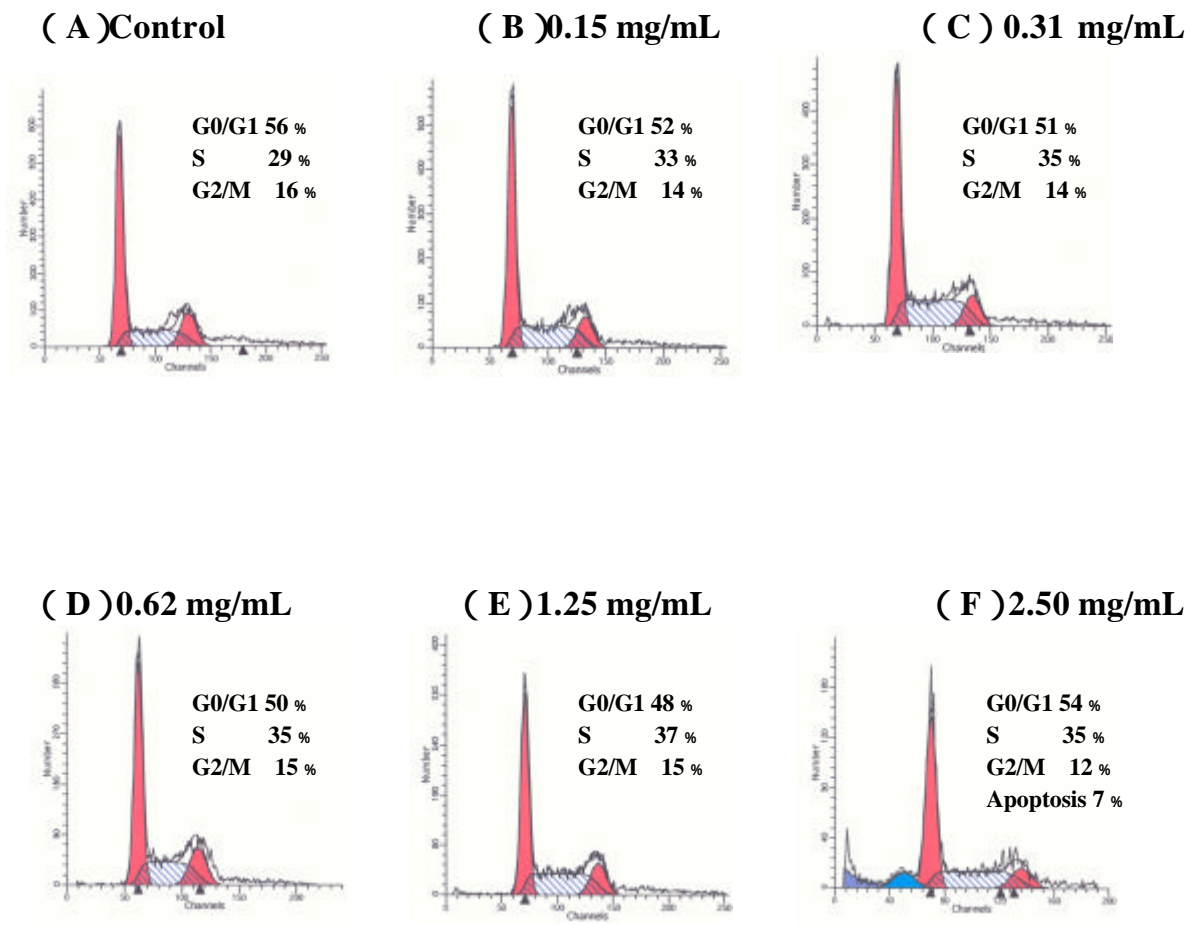


圖 4-5、序列濃度的台南五號黑豆水提取物 (0~2.50 mg/mL) 處理人類雌激素依賴型乳癌細胞株 48 小時後，其細胞週期變化的情形。將 0~2.50 mg/mL 台南五號黑豆水提取物加入人類雌激素依賴型乳癌細胞株 (MCF-7) 中培養 48 小時後，利用流式細胞儀(Flow cytometry; FACS)檢測細胞週期變化的情形，數據以 Modfit LT[®]軟體進行處理分析。(A) ~ (F) 為不同濃度的台南五號黑豆水提取物，其濃度分別如下：(A) 0 mg/mL (B) 0.15 mg/mL (C) 0.31 mg/mL (D) 0.62 mg/mL (E) 1.25 mg/mL (F) 2.50 mg/mL。

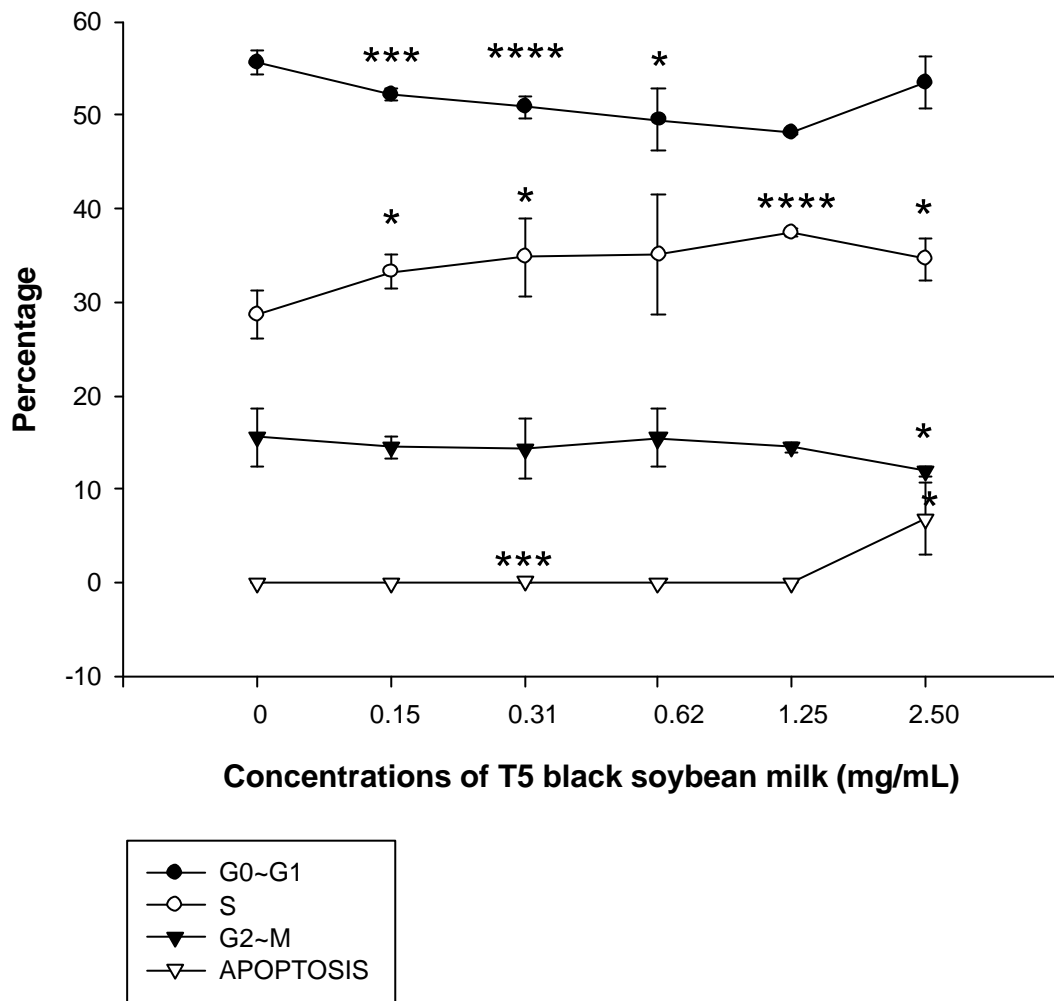


圖 4-6、序列濃度的台南五號黑豆水提取物 (0~2.50 mg/mL) 處理人類雌激素依賴型乳癌細胞株 48 小時後，其細胞週期變化的統計分析。數據以 SigmaPlot 2000 軟體進行處理分析。數據結果以平均值±標準偏差 (mean±SD) 表示，n=3。
*代表 P<0.05；**代表 P<0.02；***代表 P<0.01；****代表 P<0.001。

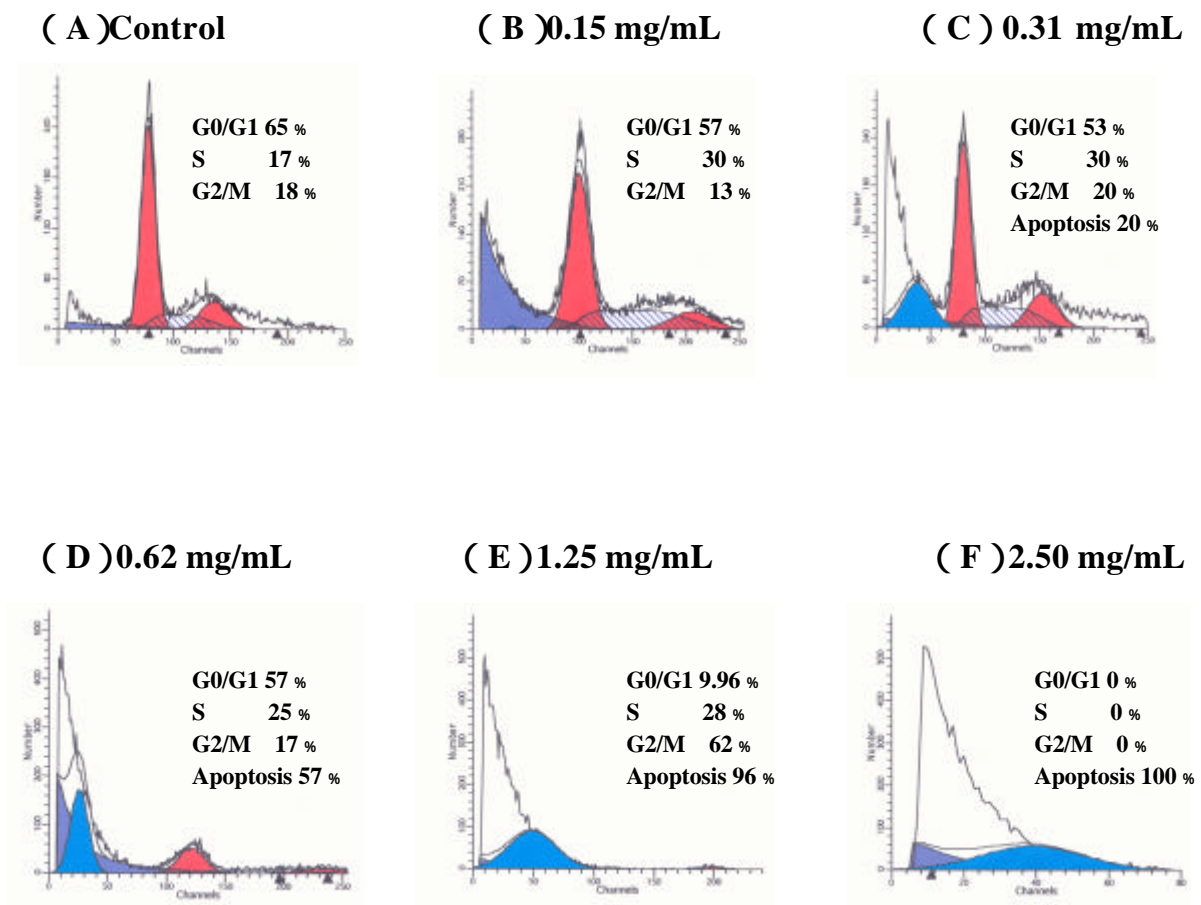


圖 4-7、序列濃度的台南五號黑豆水提取物 (0~2.50 mg/mL) 處理人類雌激素依賴型乳癌細胞株 72 小時後，其細胞週期變化的情形。將 0~2.50 mg/mL 台南五號黑豆水提取物加入人類雌激素依賴型乳癌細胞株 (MCF-7) 中培養 72 小時後，利用流式細胞儀(Flow cytometry; FACS)檢測細胞週期變化的情形，數據以 Modfit LT[®]軟體進行處理分析。(A) ~ (F) 為不同濃度的台南五號黑豆水提取物，其濃度分別如下：(A) 0 mg/mL (B) 0.15 mg/mL (C) 0.31 mg/mL (D) 0.62 mg/mL (E) 1.25 mg/mL (F) 2.50 mg/mL。

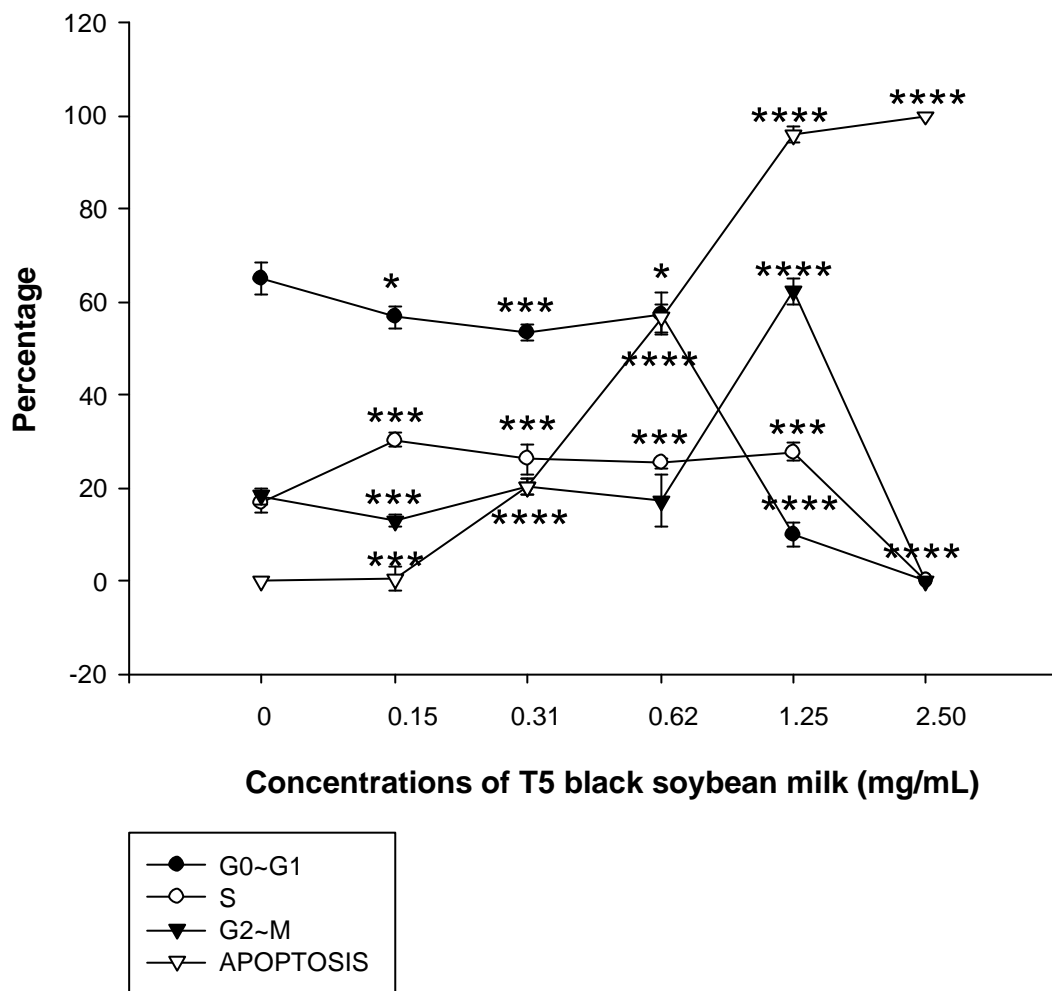


圖 4-8、序列濃度的台南五號黑豆水提取物 (0~2.50 mg/mL) 處理人類雌激素依賴型乳癌細胞株 72 小時後，其細胞週期變化的統計分析。數據以 SigmaPlot 2000 軟體進行處理分析。數據結果以平均值±標準偏差 (mean±SD) 表示，n=3。
*代表 P<0.05；**代表 P<0.02；***代表 P<0.01；****代表 P<0.001。

三、序列濃度之黑豆水提取物對人類雌激素依賴型乳癌細胞株形態之影響

利用倒立式位像差顯微鏡觀察，以台南五號黑豆水提取物處理人類乳癌細胞 48 小時後，細胞型態之變化情形（圖 4-9）。未以？豆漿處理的 MCF-7 細胞形態為多角形（圖 4-9，(A) a）；而以？豆漿處理的顯微鏡圖像能見得到一些豆渣之殘留（圖 4-9，(D) c），伴隨著濃度增加，其存活細胞數目明顯減少，也有空泡化現象（圖 4-9，(B) b）。

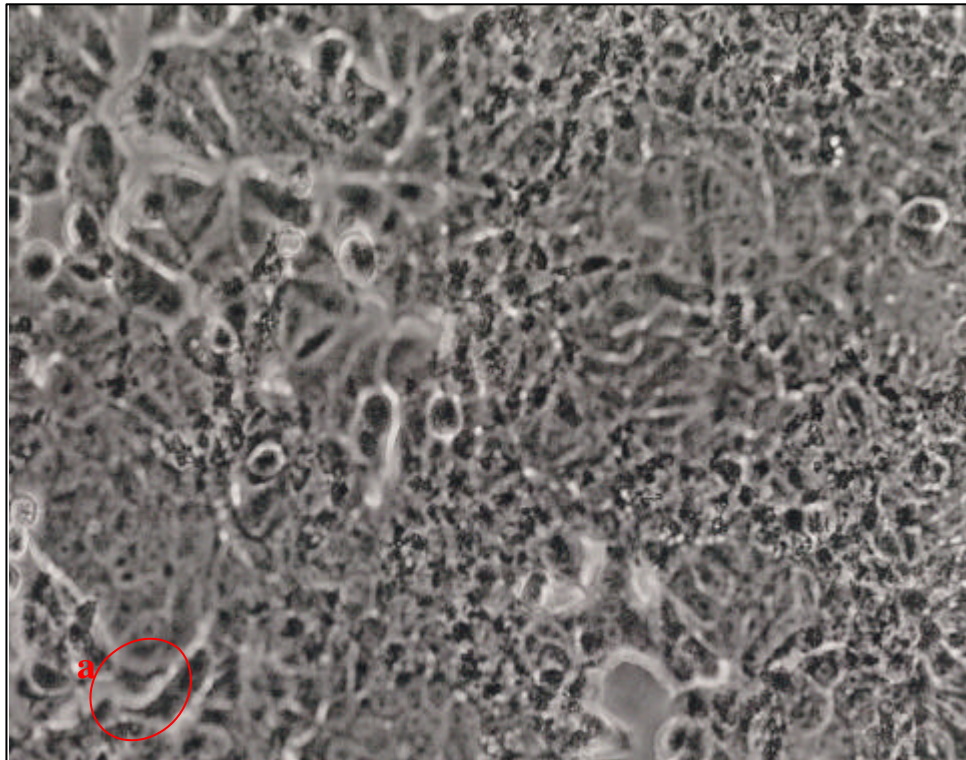


圖 4-9 (A) 乳癌細胞 MCF-7，經 0 mg/mL 濃度之台南五號？豆水提取物處理 48 小時後，以倒立式位像差顯微鏡觀察之 MCF-7 細胞型態

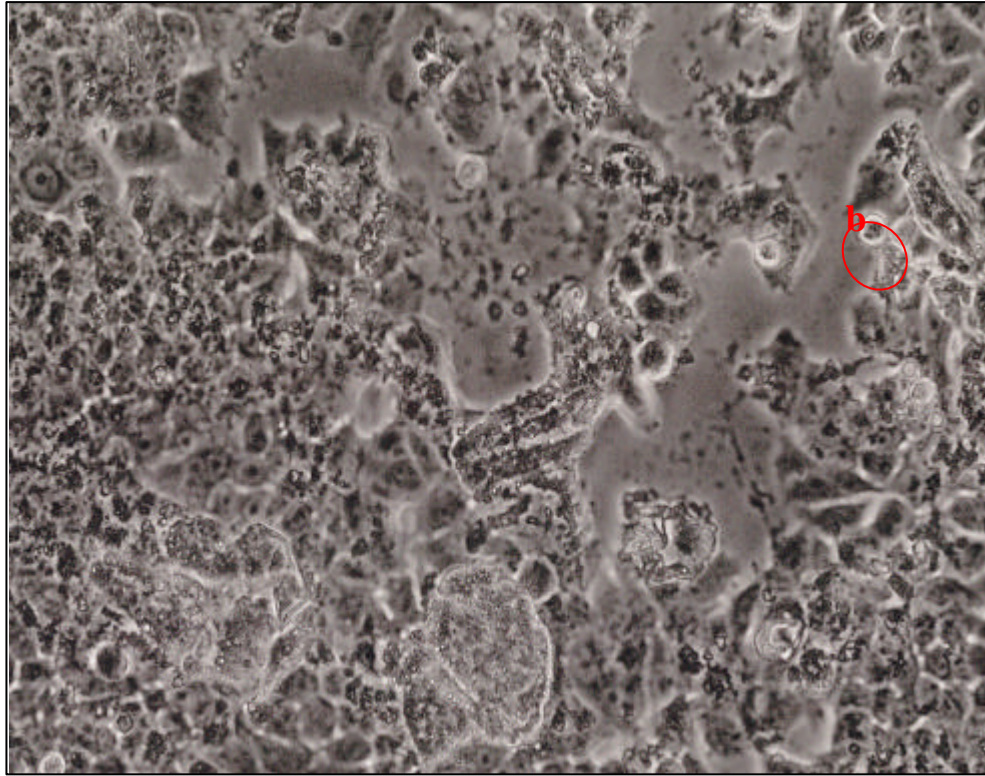


圖 4-9 (B) 乳癌細胞 MCF-7 , 經 0.15 mg/mL 濃度之台南五號? 豆水提取物處理 48 小時後 , 以倒立式位像差顯微鏡觀察之 MCF-7 細胞型態

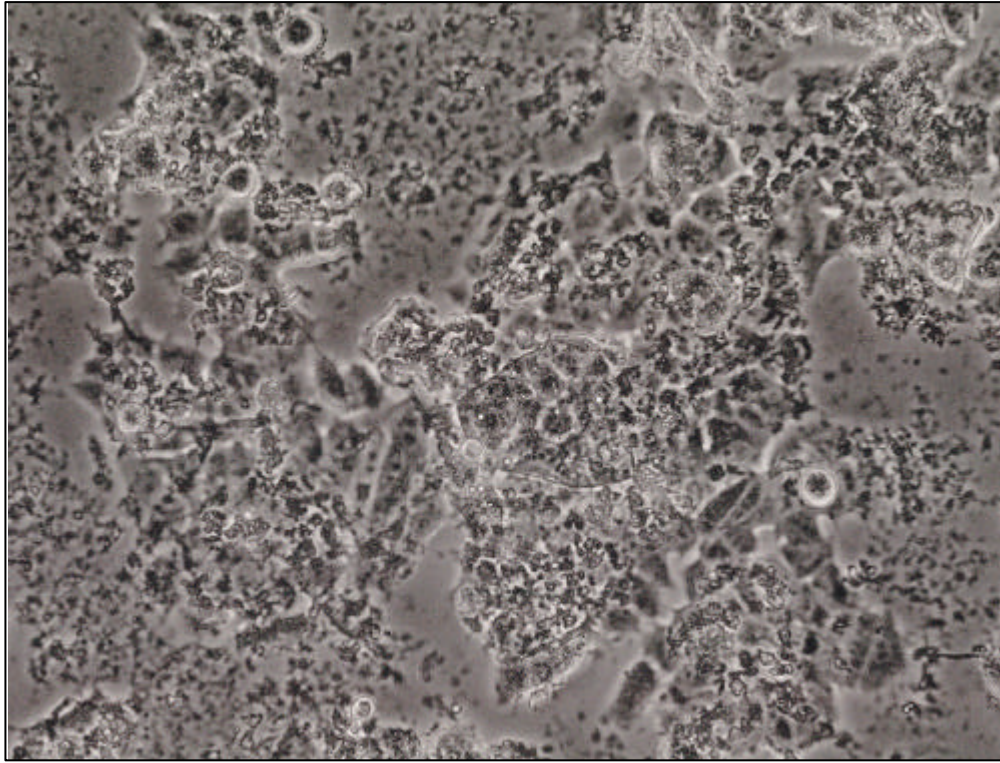


圖 4-9 (C) 乳癌細胞 MCF-7 , 經 0.31 mg/mL 濃度之台南五號? 豆水提取物處理 48 小時後 , 以倒立式位像差顯微鏡觀察之 MCF-7 細胞型態

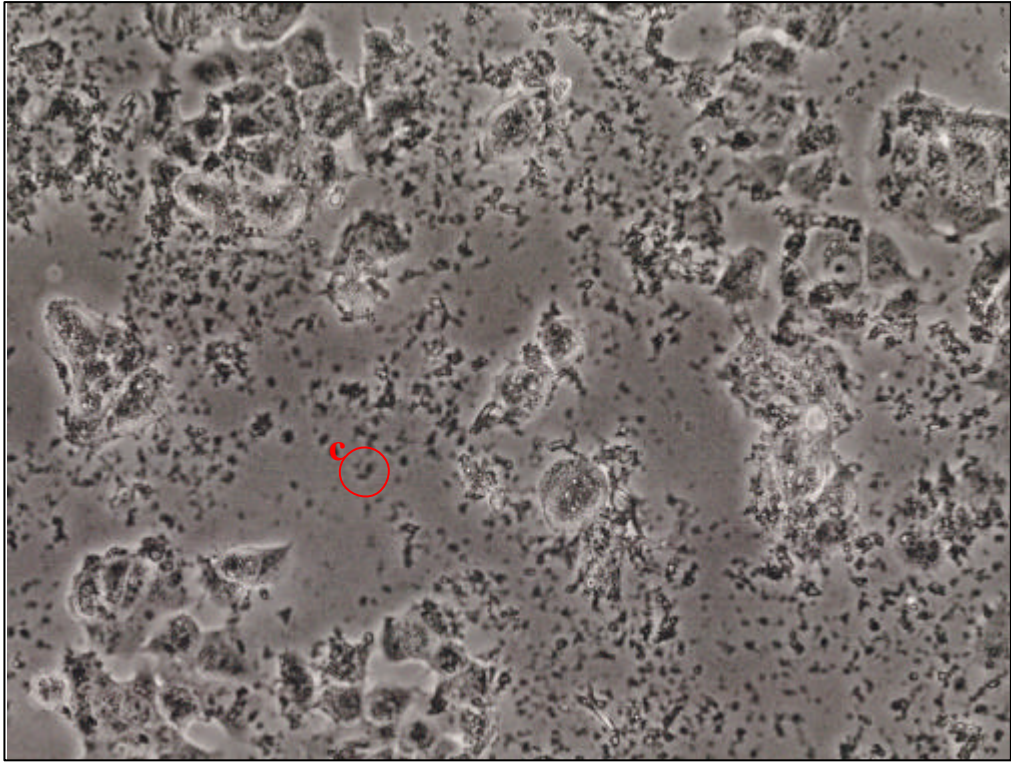


圖 4-9 (D) 乳癌細胞 MCF-7 , 經 0.62 mg/mL 濃度之台南五號? 豆水提取物處理 48 小時後 , 以倒立式位像差顯微鏡觀察之 MCF-7 細胞型態

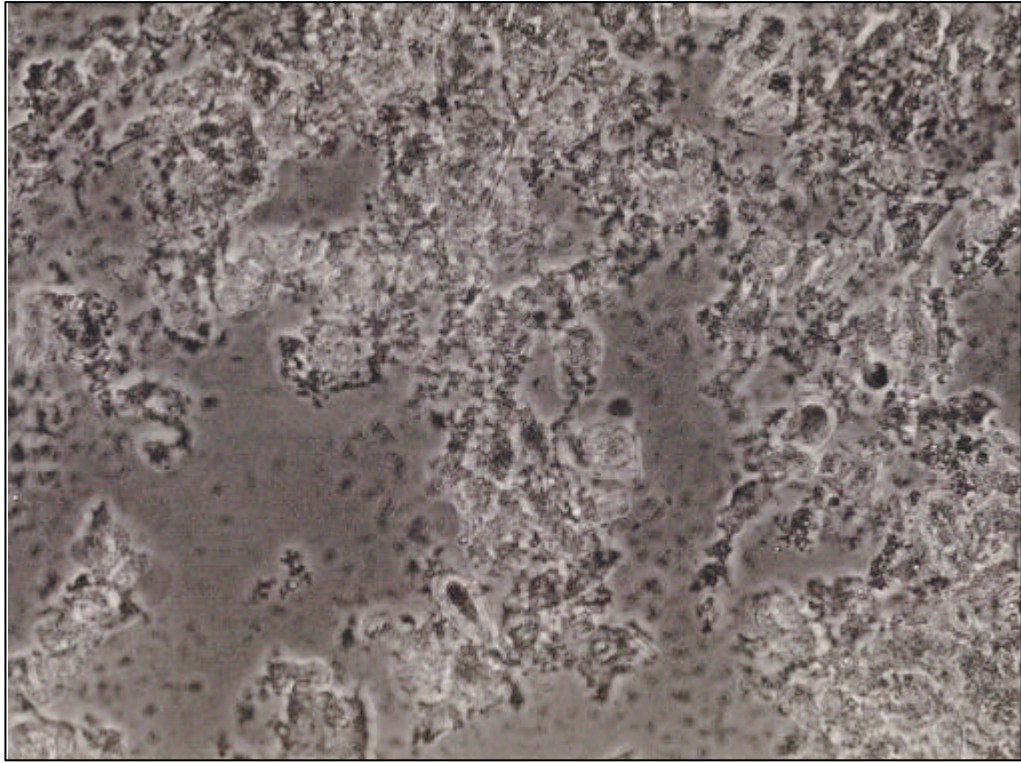


圖 4-9 (E) 乳癌細胞 MCF-7 ，經 1.25 mg/mL 濃度之台南五號？ 豆水提取物處理 48 小時後，以倒立式位像差顯微鏡觀察之 MCF-7 細胞型態

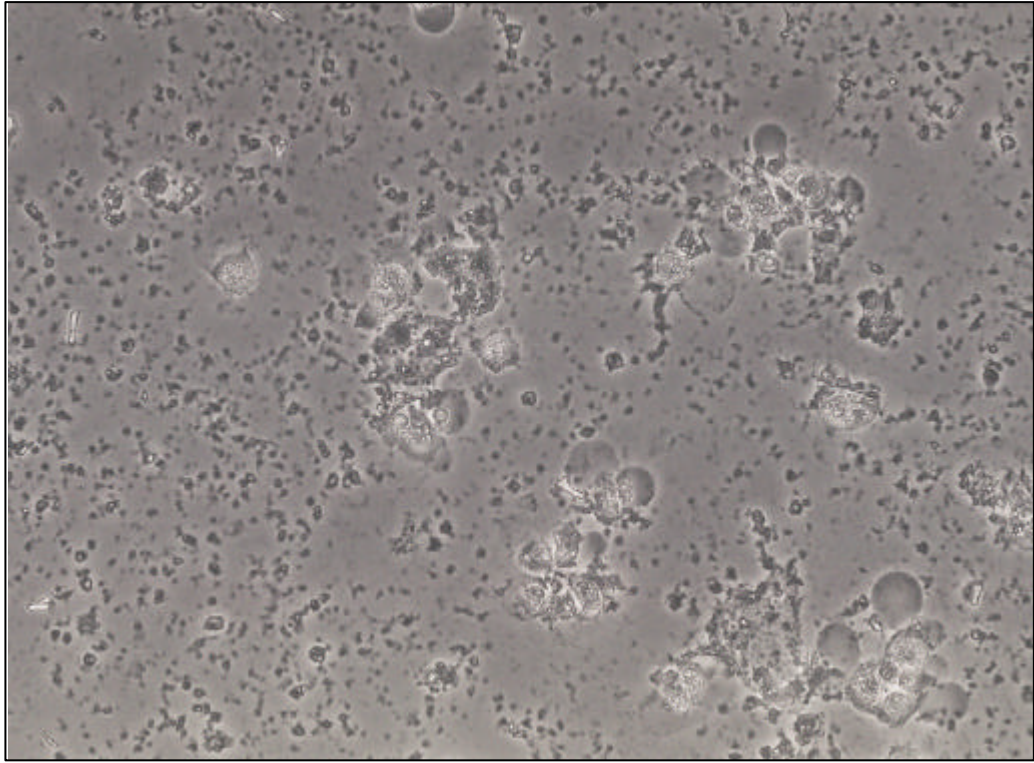
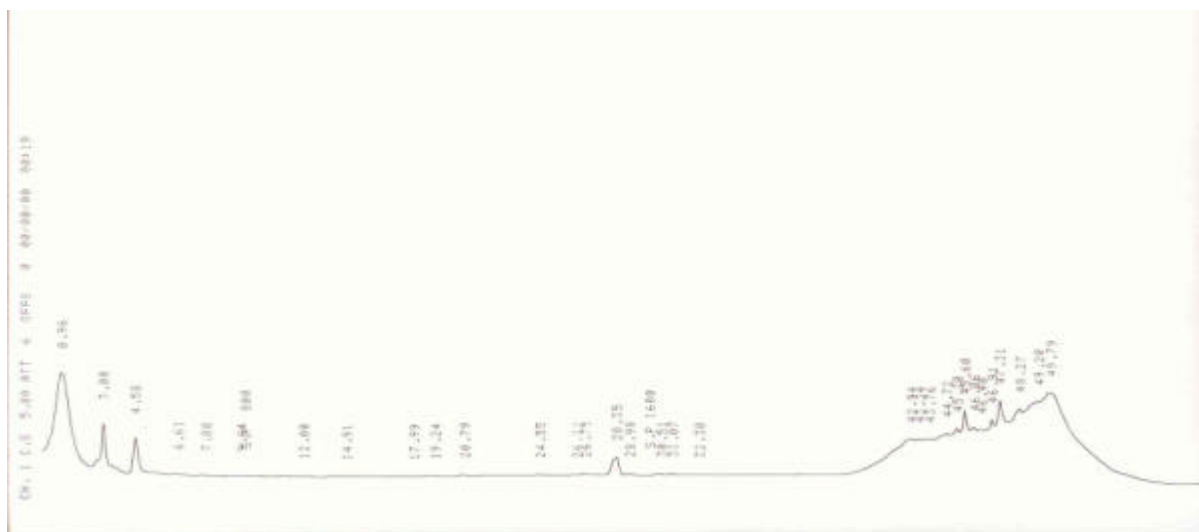


圖 4-9 (F) 乳癌細胞 MCF-7 , 經 2.50 mg/mL 濃度之台南五號? 豆水提取物處理 48 小時後 , 以倒立式位像差顯微鏡觀察之 MCF-7 細胞型態

四、建立異黃酮標準曲線之結果

為確認管柱內無任何前次殘留之干擾物，首先需讓管柱在不注入任何樣品之情形下，完成一次已設定好之沖提流程，得到 RP-HPLC 之分析圖（圖 4-10）。



將各種異黃酮標準品的原液再分別稀釋成 1/2、1/4、1/8、1/16、1/32、1/64 及 1/128 倍原液濃度（表 4-2）。

表4-2、異黃酮標準品原液與其不同稀釋濃度之標準液

異黃酮 標準品 (mg/mL) 標準品 稀釋倍數	daidzein	genistein	formononetin	biochanin A	6-methoxyflavanone ^a
原液	1.500	1.500	1.800	0.350	3.300
1/2	0.750	0.750	0.900	0.175	1.650
1/4	0.375	0.375	0.450	0.088	0.825
1/8	0.188	0.188	0.225	0.044	0.412
1/16	0.094	0.094	0.113	0.022	0.206
1/32	0.046	0.046	0.056	0.011	0.103
1/64	0.023	0.023	0.028	0.005	0.052
1/128	0.012	0.012	0.014	0.003	0.026

^a6-methoxyflavanone 當作內標準品。

以 HPLC 分析序列濃度的標準品，作出異黃酮標準品檢量線。首先由不同異黃酮標準品之原液中，各取出 10 μ L 之不同標準品，混合均勻後，由異黃酮標準品之原液混合液中取出 50 μ L，以 HPLC 注射針注入逆相高壓液相層析儀（reverse phase-high pressure liquid chromatography；RP-HPLC），分析各異黃酮之組成及含量（圖 4-11）。

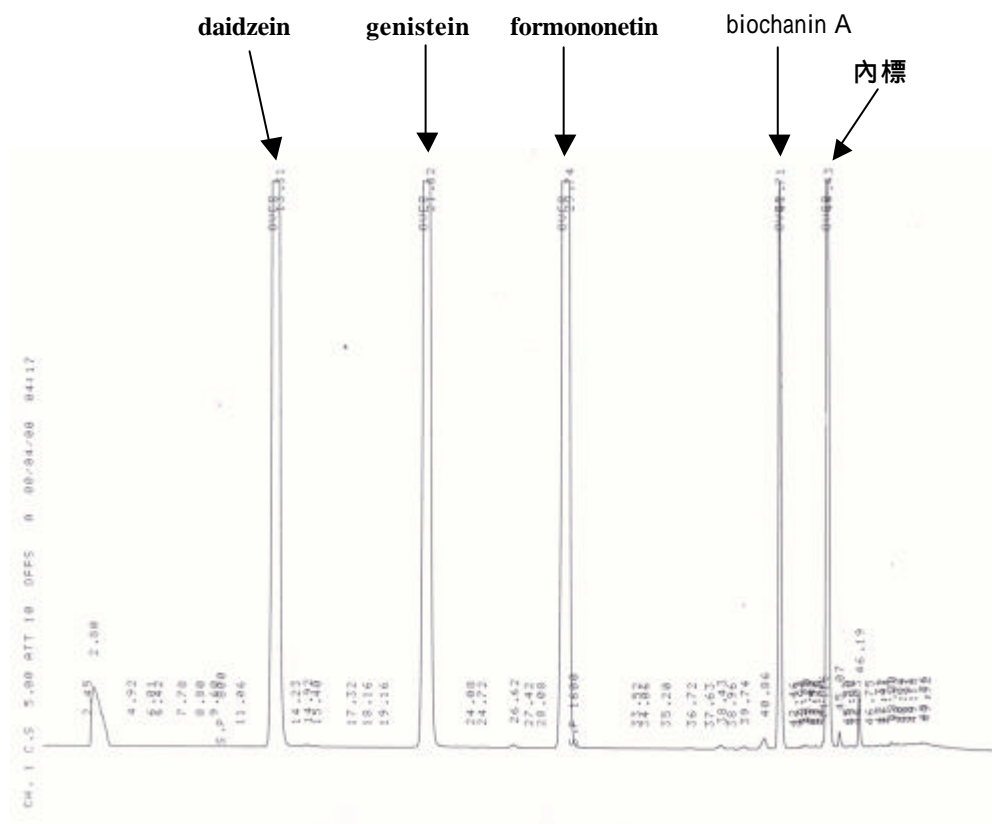


圖4-11、異黃酮標準品原液混合液之HPLC分析圖。10 μ L的異黃酮標準品原液混合液，包含濃度 15 μ g/mL daidzein，15 μ g/mL genistein，18 μ g/mL formononetin，3.5 μ g/mL biochanin A，及內標33 μ g/mL 6-methoxyflavanone，經HPLC分析後滯留時間（retention time；Rt）分別為13.31、21.82、29.74、41.71及44.43分鐘。

由五種異黃酮標準品原液之 1/2 倍稀釋液中，各取出 10 μ L，混合均勻後，混合液中取出 50 μ L，以 HPLC 注射針注入逆相高壓液相層析儀，分析各異黃酮之組成及含量（圖 4-12）。

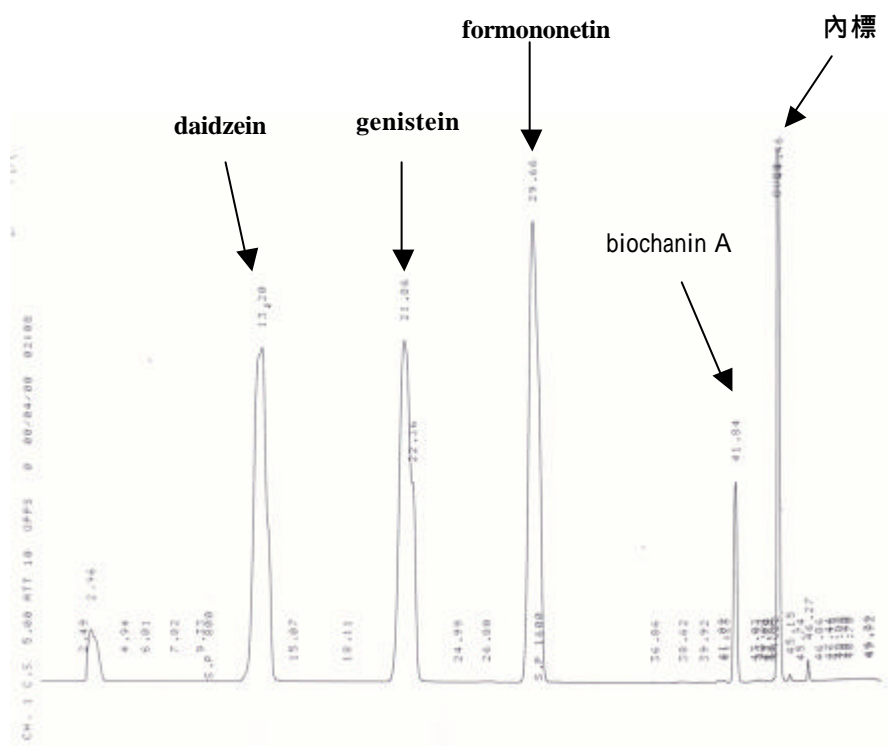


圖 4-12、五種異黃酮標準品原液 1/2 倍稀釋液之混合液的 HPLC 分析圖。異黃酮標準品原液 1/2 倍稀釋液之混合液經 HPLC 分析後，Rt 分別為 daidzein = 13.2 分鐘，genistein = 21.86 分鐘，formononetin = 29.66 分鐘，biochanin A = 41.84 分鐘，及內標 6-methoxyflavanone = 44.46 分鐘。

由五種異黃酮標準品原液之 1/4 倍稀釋液中，各取出 10 μ L，混合均勻後，混合液中取出 50 μ L，以 HPLC 注射針注入逆相高壓液相層析儀，分析各異黃酮之組成及含量（圖 4-13）。

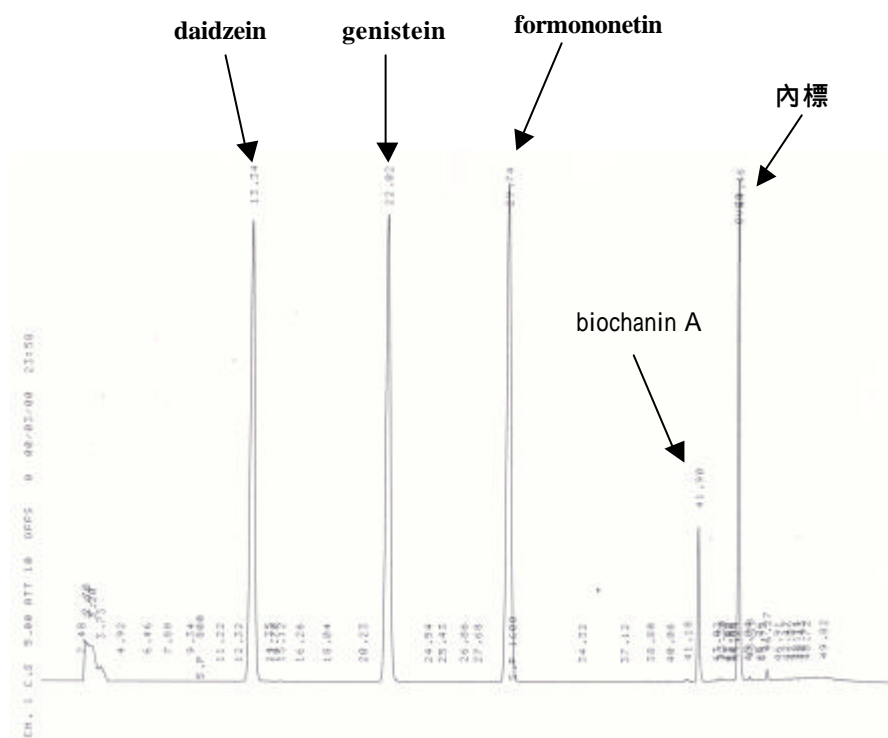


圖 4-13、五種異黃酮標準品原液 1/4 倍稀釋液之混合液的 HPLC 分析圖。異黃酮標準品原液 1/4 倍稀釋液之混合液經 HPLC 分析後，Rt 分別為 daidzein = 13.34 分鐘，genistein = 22.02 分鐘，formononetin = 29.74 分鐘，biochanin A = 41.9 分鐘，及內標 6-methoxyflavanone = 44.46 分鐘。

由五種異黃酮標準品原液之 1/8 倍稀釋液中，各取出 10 μ L，混合均勻後，混合液中取出 50 μ L，以 HPLC 注射針注入逆相高壓液相層析儀，分析各異黃酮之組成及含量（圖 4-14）。

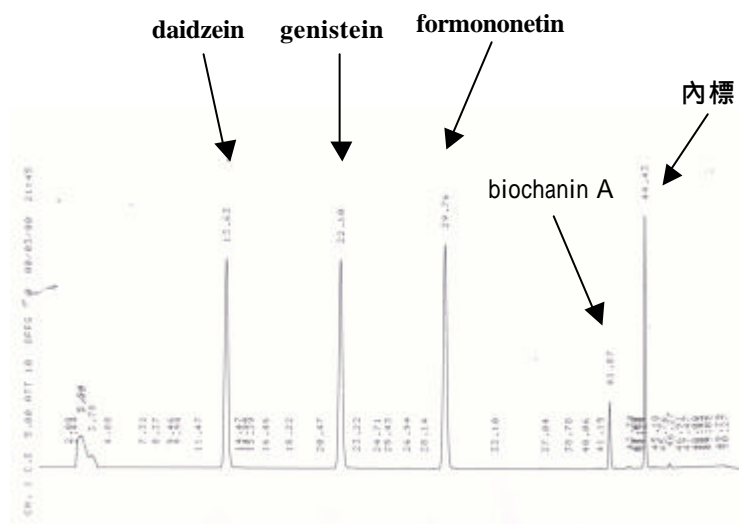


圖 4-14、五種異黃酮標準品原液 1/8 倍稀釋液之混合液的 HPLC 分析圖。異黃酮標準品原液 1/8 倍稀釋液之混合液經 HPLC 分析後，Rt 分別為 daidzein = 13.63 分鐘，genistein = 22.1 分鐘，formononetin = 29.76 分鐘，biochanin A = 41.87 分鐘，及內標 6-methoxyflavanone = 44.43 分鐘。

由五種異黃酮標準品原液之1/16倍稀釋液中，各取出10 μ L，混合均勻後，混合液中取出50 μ L，以HPLC注射針注入逆相高壓液相層析儀，分析各異黃酮之組成及含量（圖4-15）。

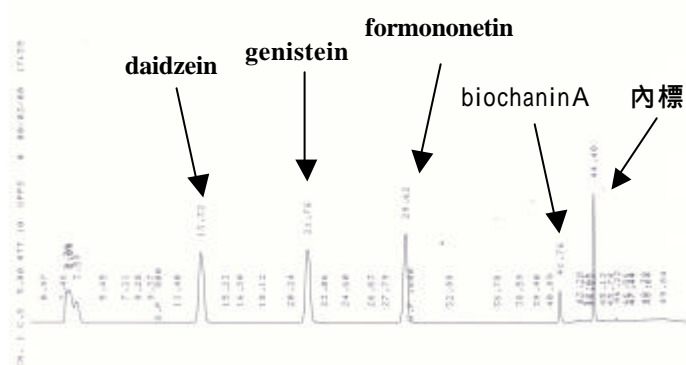


圖 4-15、五種異黃酮標準品原液 1/16 倍稀釋液之混合液的 HPLC 分析圖。異黃酮標準品原液 1/16 倍稀釋液之混合液經 HPLC 分析後，Rt 分別為 daidzein = 13.32 分鐘，genistein = 21.78 分鐘，formononetin = 29.62 分鐘，biochanin A = 41.76 分鐘，及內標 6-methoxyflavanone = 44.4 分鐘。

由五種異黃酮標準品原液之1/32倍稀釋液中，各取出10 μ L，混合均勻後，混合液中取出50 μ L，以HPLC注射針注入逆相高壓液相層析儀，分析各異黃酮之組成及含量（圖4-16）。

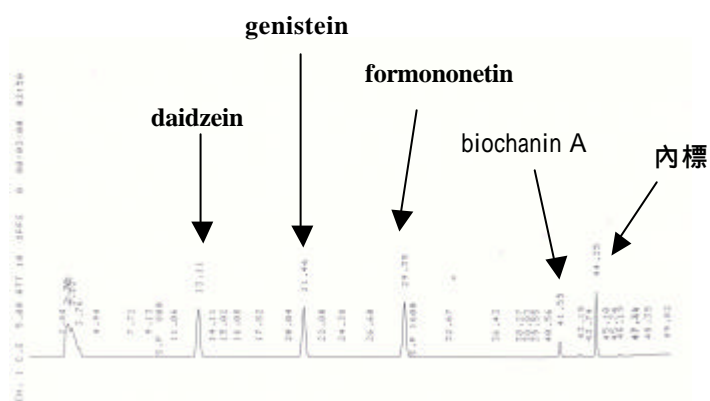


圖 4-16、五種異黃酮標準品原液 1/32 倍稀釋液之混合液的 HPLC 分析圖。異黃酮標準品原液 1/32 倍稀釋液之混合液經 HPLC 分析後，Rt 分別為 daidzein = 13.11 分鐘，genistein = 21.46 分鐘，formononetin = 29.35 分鐘，biochanin A = 41.55 分鐘，及內標 6-methoxyflavanone = 44.35 分鐘。

由五種異黃酮標準品原液之1/64倍稀釋液中，各取出10 μ L，混合均勻後，混合液中取出50 μ L，以HPLC注射針注入逆相高壓液相層析儀，分析各異黃酮之組成及含量（圖4-17）。

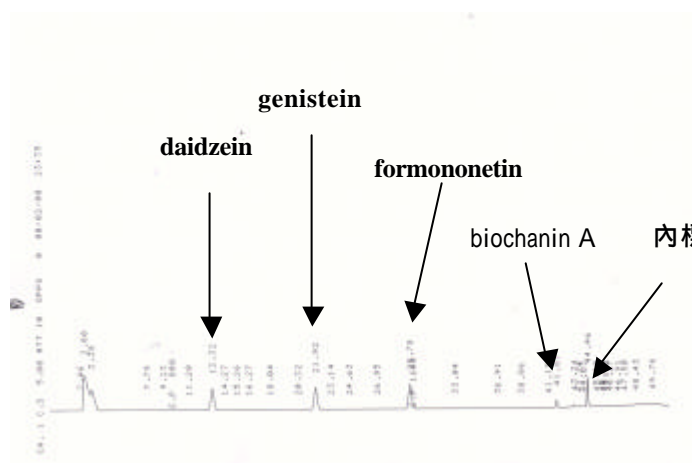
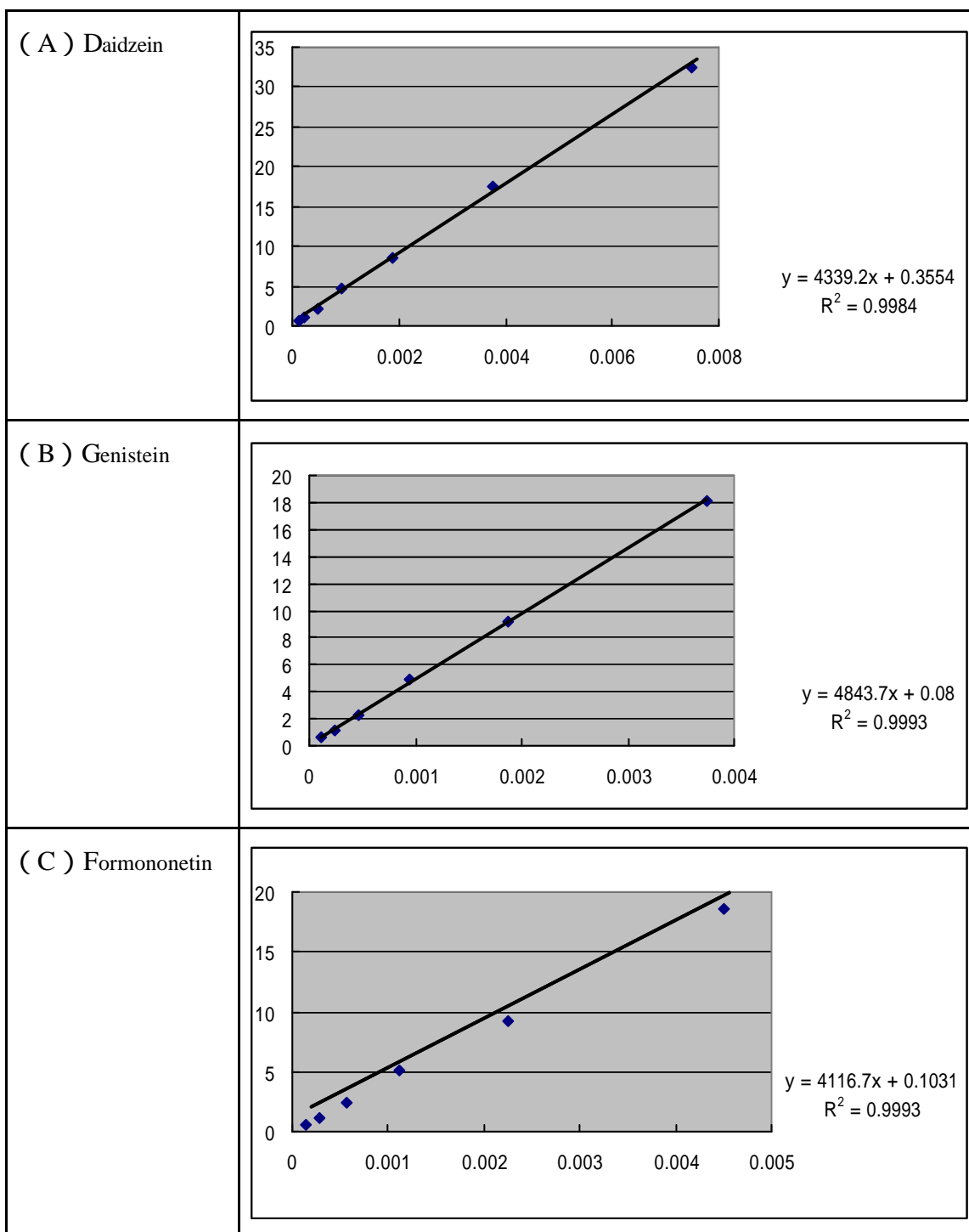


圖 4-17、五種異黃酮標準品原液 1/64 倍稀釋液之混合液的 HPLC 分析圖。異黃酮標準品原液 1/64 倍稀釋液之混合液經 HPLC 分析後，Rt 分別為 daidzein = 13.32 分鐘，genistein = 21.92 分鐘，formononetin = 29.78 分鐘，biochanin A = 41.87 分鐘，及內標 6-methoxyflavanone = 44.46 分鐘。

序列稀釋的各種異黃酮標準品之混合液，注入HPLC後所得到之各波峰面積，經詳細計算後建立異黃酮標準品之檢量線圖（圖4-18）。



(D) Biochanin A

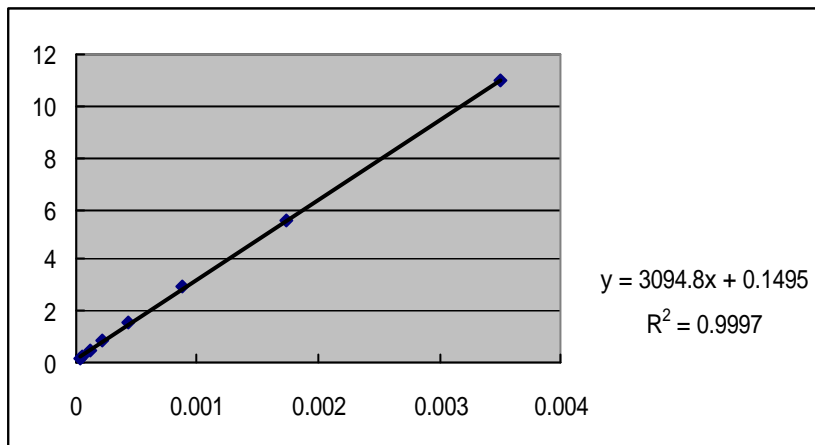


圖 4-18、各異黃酮標準品之檢量線

序列濃度的各種異黃酮標準品 (A) daidzein , (B) genistein , (C) formononetin 及 (D) biochanin A 之分析圖 , 用 Excel 作標準品之檢量線圖 , 並求出二元一次方程式。

五、黑豆水提取物及甲醇提取物之異黃酮種類分析及定量

(一) 台南五號黑豆水提取物之異黃酮種類分析及定量

台南五號黑豆水提取物注入液相層析儀，以 RP- C18 逆相層柱管柱分析，流洗出來之化合物以紫外光偵測器偵測，如圖 4-19，將台南五號黑豆水提取物樣品波峰面積與標準品比較，根據所建立的異黃酮標準品檢量線，代入公式計算可得樣品異黃酮種類及含量。

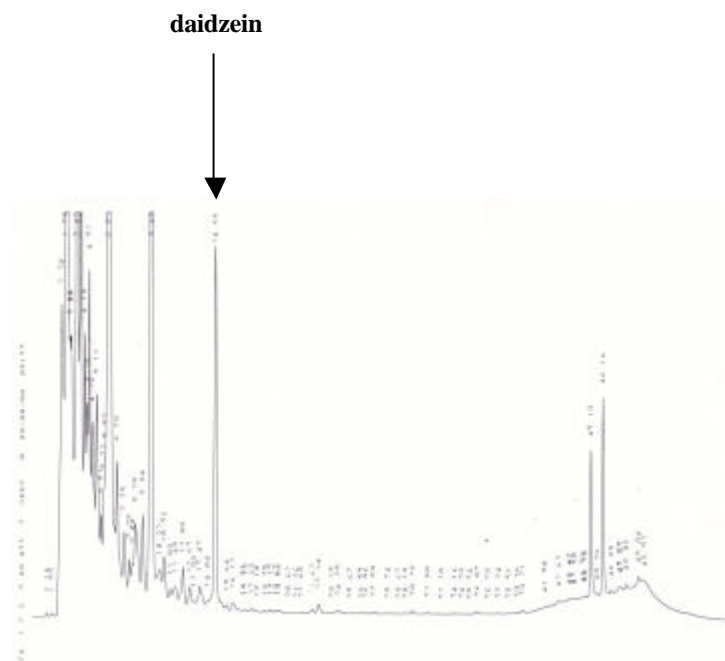


圖 4-19、台南五號黑豆水提取物之異黃酮成分之 HPLC 分析圖

根據分析圖可分析黑豆中異黃酮之成分，並根據標準品之檢量線計算出黑豆中異黃酮之含量。

根據圖 4-19 中台南五號黑豆水提取物之 HPLC 分析圖計算台南五號黑豆水提取物異黃酮成分及含量：台南五號乾燥物溶於去離子水中濃度為 2.5 mg/mL，取出 100 μ L 注射到 HPLC 儀器中進行分析，所以實際注入 0.25 mg

之黑豆。黑豆水提取物之 HPLC 分析圖中 $R_t = 14.66$ 之波峰其區域面積為 29.58173，代入異黃酮 daidzein 標準品檢量線之方程式 $y = 43.392x + 0.3554$ 後，得到 $x = 0.0067$ mg，所以 0.25 mg 的黑豆中含有 0.0067 mg 的 daidzein，即 1 mg 的黑豆含 0.0268 mg daidzein，故 daidzein 佔台南五號黑豆水提取物之百分比為 2.68 %。

(二) 台南五號黑豆甲醇提取物之異黃酮種類分析及定量

台南五號黑豆甲醇提取物注入液相層析儀，以 RP-C18 逆相層柱管柱分析，流洗出來之化合物以紫外光偵測器偵測，如圖 4-20，將台南五號黑豆甲醇提取物樣品波形面積與標準品比較，根據所建立的異黃酮標準曲線，代入公式計算可得樣品異黃酮種類及含量。

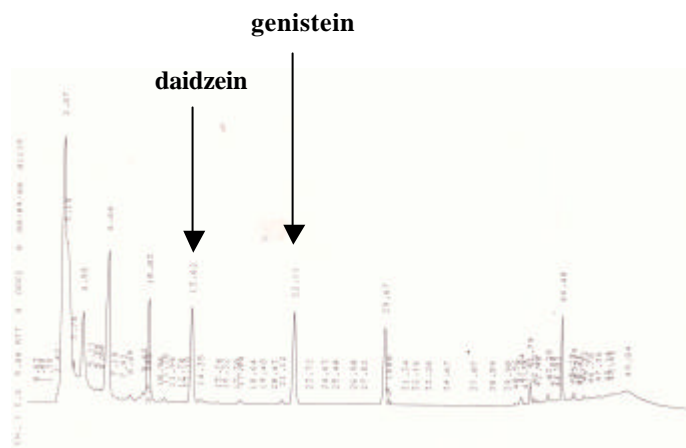


圖 4-20、台南五號黑豆甲醇提取物之異黃酮成分之 HPLC 分析圖

圖 4-20 中台南五號黑豆甲醇提取物之 HPLC 分析圖計算黑豆甲醇提取物異黃酮成分及含量：台南五號甲醇提取物溶於 99.5% 的 DMSO 中，濃度為 8 mg/mL，取 40 μ L 注入樣品注入閥，可由波形面積代入標準檢量線得到黑豆甲醇萃取出物中異黃酮含量。如圖 4-20 滯留時間 (Retention time, Rt) 13.42 分鐘為 daidzein，代入 $y = 43.392x + 0.3554$ 標準檢量線公式，計算所得黑豆甲醇提取物所含 daidzein 含量為 255.35 μ g/mL，所以 1mg 含 31.9 μ g daidzein。

另外，甲醇提取方式，台南五號黑豆的 genistein 能被萃取出來，可見甲醇提取比水提取方式 (daidzein 含量為 26.8 μ g/mg) 更能有效萃取出黑豆異黃酮組成及量。

六、台南五號黑豆之粗蛋白質定量

黑豆蛋白質定量計算：

$$0.05\text{N} \times 1/2 = 0.025\text{M}$$

$$0.025\text{M} \times 25/1000 \mu\text{L} = 0.00625$$

$$0.05 \times 25/28 = 0.0446$$

$$0.0446\text{N} \times 1 = 0.0446$$

$$0.0446 \times 22.5/1000 = 0.0010035 \dots \text{NaOH mole 數}$$

$$0.0010035 \times 1/2 = 0.00050175 \dots \text{H}_2\text{SO}_4 \text{ mole 數}$$

$$0.000625 - 0.00050175 = 0.00012325$$

$$0.00012325 \times 2(\text{氮}) \times 14 \times 6.25 = 0.02156\text{g}$$

$$1 \text{ g}/400 \text{ mL} \times 20 \text{ mL} = 0.05 \text{ g}$$

$$0.02156/0.05 \times 100\% = 43.12\%$$

$$\text{protein}\% = 28 - 22.5 \times 1 \times 0.0007 \times 6.25 \times 100/1 \times 20$$

$$= 48.125\%$$

結果得到台南五號黑豆粗蛋白質含量為 48%，與文獻報導其蛋白質含量約 43% 之結果接近。

第二節 合成胜？對人類雌激素依賴型乳癌細胞之實驗

一、表面漿體共振 (Surface Plasmon Resonance, SPR)技術篩選具有 Grb2 SH2 親和力之胜？

應用生物感應器之表面膜漿共振技術建立篩選與 Grb2 SH2 高親和力及專一性之胜？之方法。首先晶片製備(圖 4-21)方式是將純化後之 Grb2 SH2 或 GST-Grb2 SH2 蛋白質固定(immobilization)於生物感應器之 CM5 晶片的表面【93】，此固定於晶片上之 GSTGrb2 SH2 蛋白質定義為鍵合物(ligand)。實驗過程中，首先注入 EDC/NHS 使得晶片表面之 carboxymethyl 官能基被活化，再注射經過活化的表面，GST-Grb2-SH2 即可被耦合於晶片。最後再把晶片注射 ethanolamine 作去活化的步驟。感應圖上觀察到反應單位(RU)之增加且維持穩定數值，即表示 Grb2 SH2 已經固著於 CM5 晶片的表面。

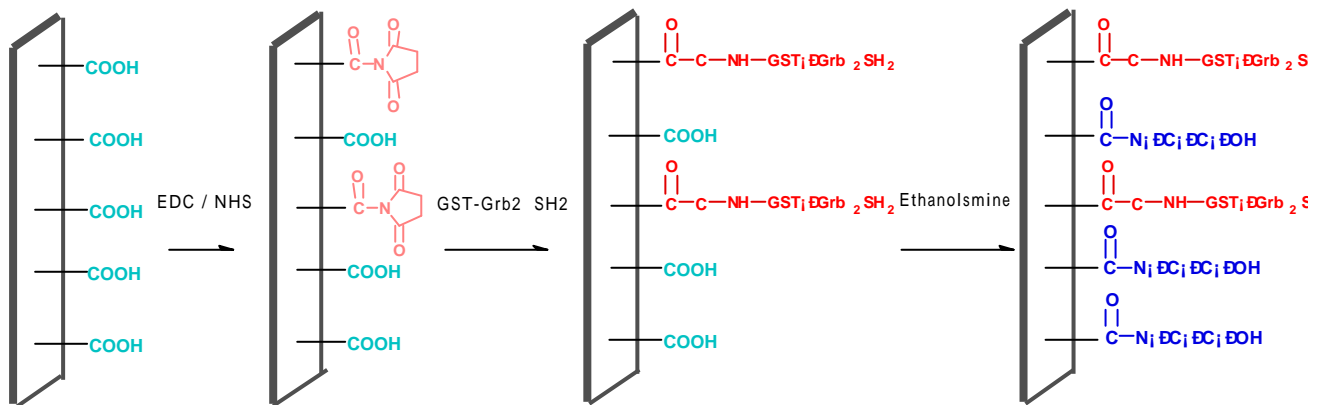


圖 4-21、蛋白質晶片之製備

接著將不同濃度之 Shc(pY) 胜? 或其他設計的合成胜? , 個別注入固定有 GST-Grb2 SH2 之 CM5 生物感應晶片, 再分析 Shc(pY) (圖 4-22) 及合成胜? (圖 4-23) 與 GST-Grb2 SH2 區塊分子間的交互作用情形。

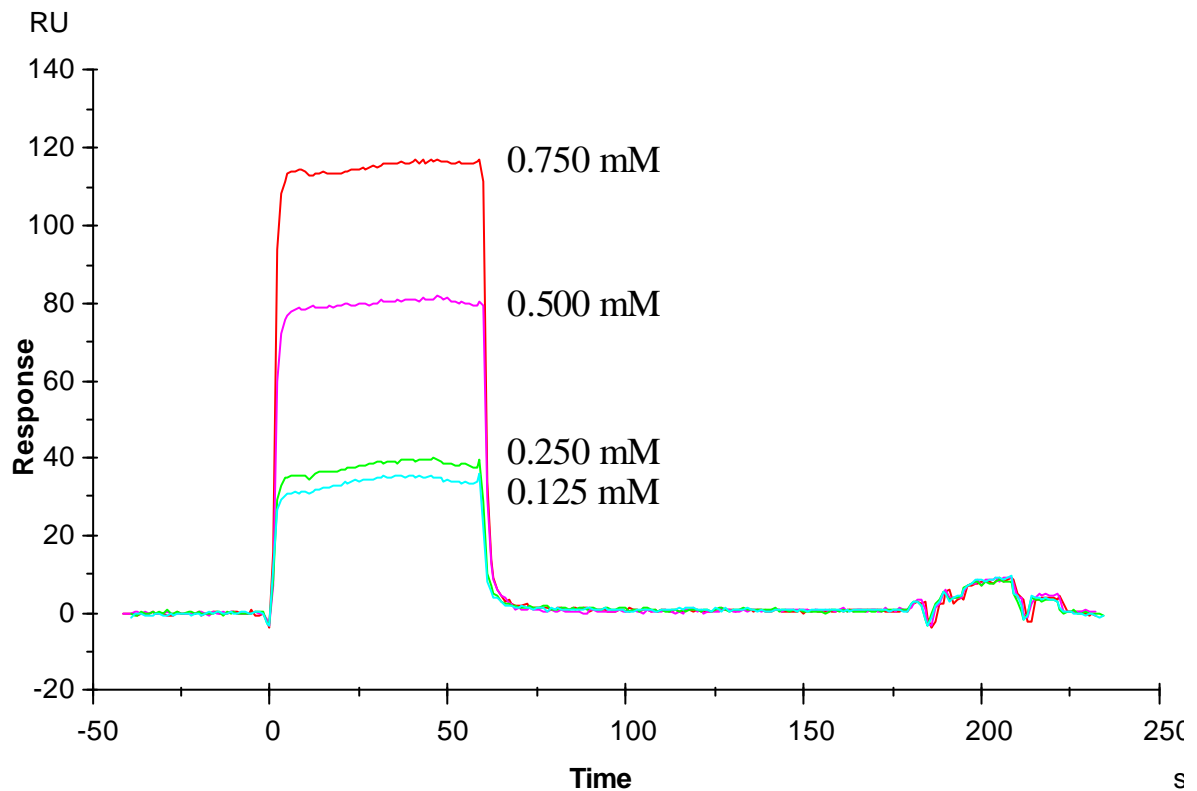


圖 4-22、以 BIAcoreX 生物感應器分析 GST-Grb2 SH2 區塊與 Shc(pY) 之交互作用感應圖

CM5 生物感應晶片經活化, 固定 GST-Grb2 SH2, 再讓序列稀釋的 Shc(pY) 流經有 GST-Grb2 SH2 的晶片, 可由折射光角度的變化, 得知兩者之間交互作用情形。

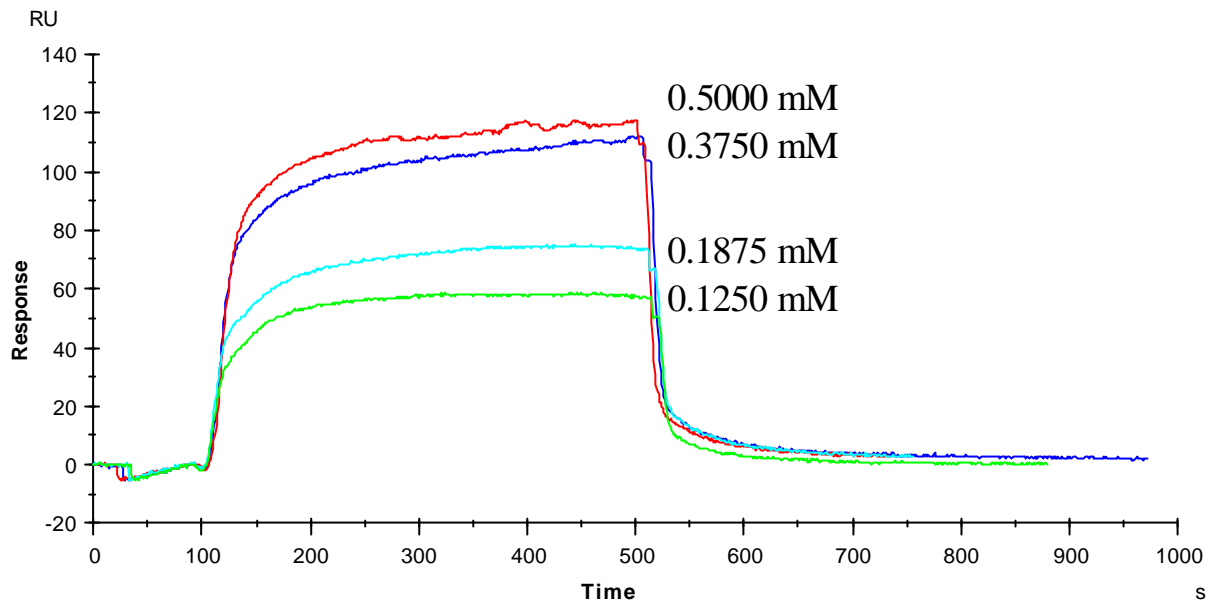


圖 4-23、以 BIAcoreX 生物感應器分析 Grb2 SH2 區塊與合成胜? 之交互作用感應圖

CM5 生物感應晶片經活化，固定 Grb2 SH2，再讓序列稀釋的 peptide 3 流經有 Grb2 SH2 的晶片，可由折射光角度的變化，得知兩者之間交互作用情形。

二、鑑定合成之胜?

大量製備對 Grb2 SH2 高親和力及專一性之胜? peptide 3, 經 RP-HPLC 分析 (圖 4-24) 及快速原子撞擊質譜儀鑑定分子量 (圖 4-25) 後, 冷凍乾燥成粉末, 便可進行生物活性分析。

(一) 逆相高效能液相層析分析儀分析

以 RP-HPLC 分析所合成之胜? peptide 3, UV 偵測波長為 225 nm, 由積分儀得到如下分析圖。

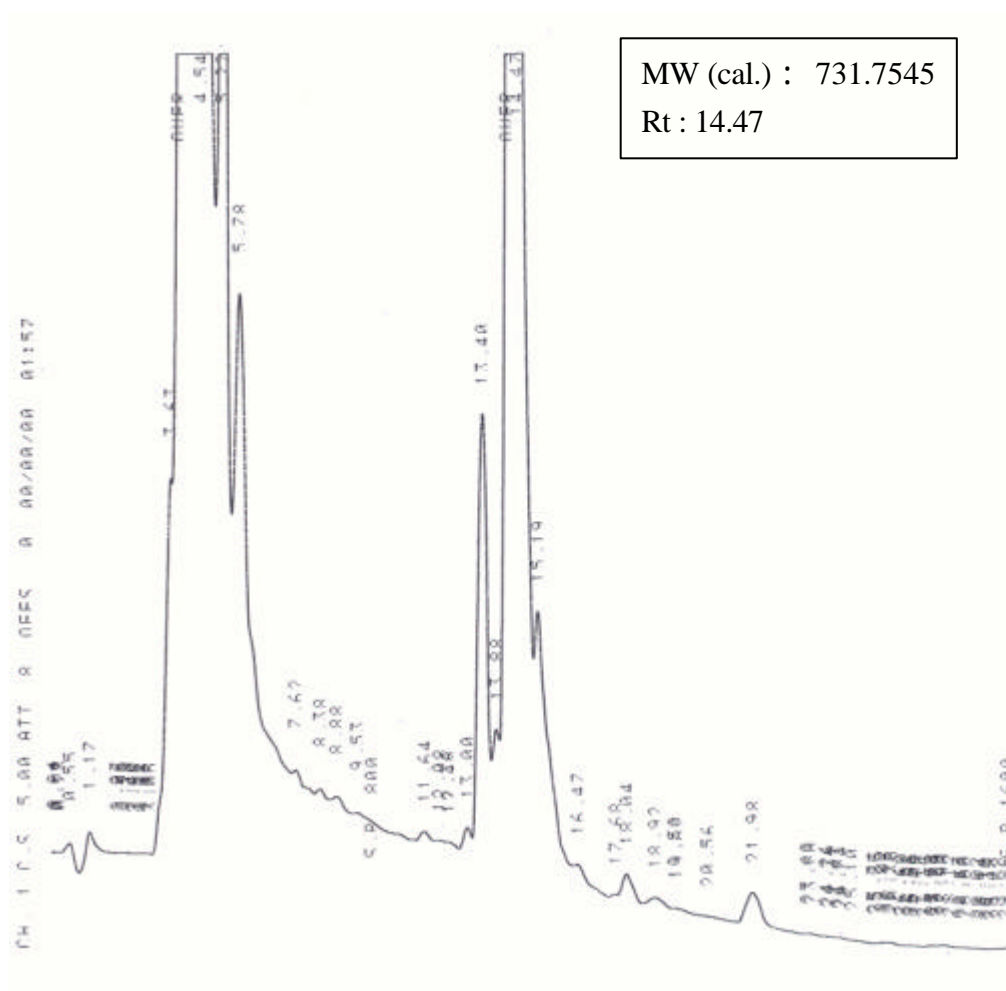


圖 4-24、合成胜? peptide 3 之 HPLC 分析圖

(二) 快速原子撞擊質譜儀之胜? 分子量鑑定

Fmoc-Glu-Tyr-Aib-Asn-NH₂ (peptide 3):

$$\begin{aligned} \text{MW (cal.)} &= 224.25 + 129.1155 + 163.1760 + (325.36 - 224.25) + 114.1039 \\ &= 731.7545 \end{aligned}$$

$$\text{MW (det.)} = 731.8$$

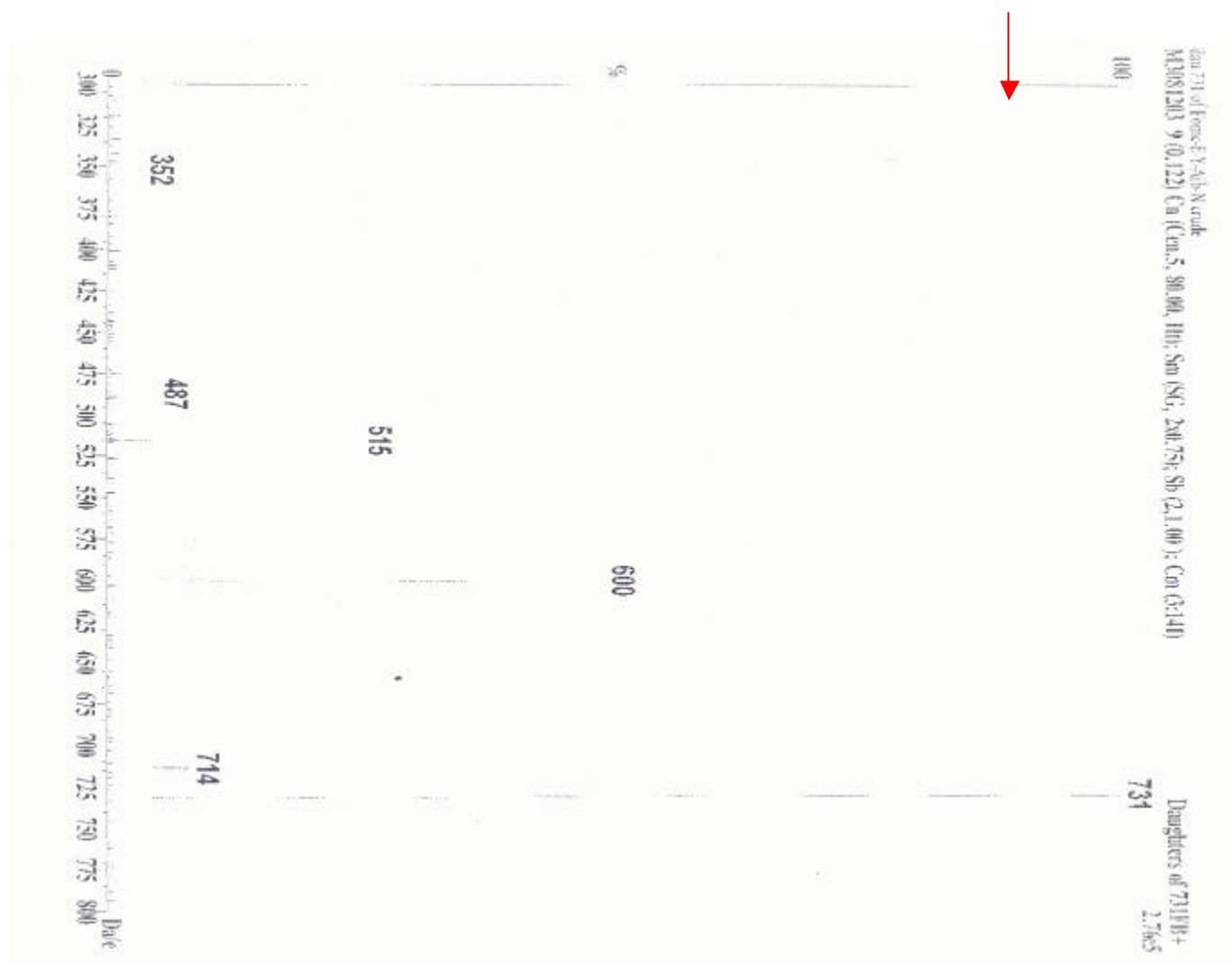


圖 4-25、線狀胜? peptide 3 之 FAB-MS Spectrophotometry

三、序列濃度之合成胜？對人類雌激素依賴型乳癌細胞株存活率之影響

人類乳癌細胞株 MCF-7 收集之後分盤，以 12 孔洞平盤培養於 37 °C、5 % CO₂ 條件下培養 24 小時，待細胞貼附完全再行加藥；經過 48 及 72 小時之有無 peptide 3 處理（最終濃度為 0、12.5、25.0、37.5、50.0、62.5 μM）後，利用流式細胞儀評估存活細胞數，經統計後以細胞存活百分率（%）表示於圖 4-26。結果 peptide 3 濃度 37.5、50.0、62.5 μM 處理 48 小時後，有明顯降低 MCF-7 細胞存活率的情形（A）。而處理 72 小時那組（B），在 peptide 3 濃度 25.0 μM 時，便明顯降低了 MCF-7 細胞存活率。

(A)

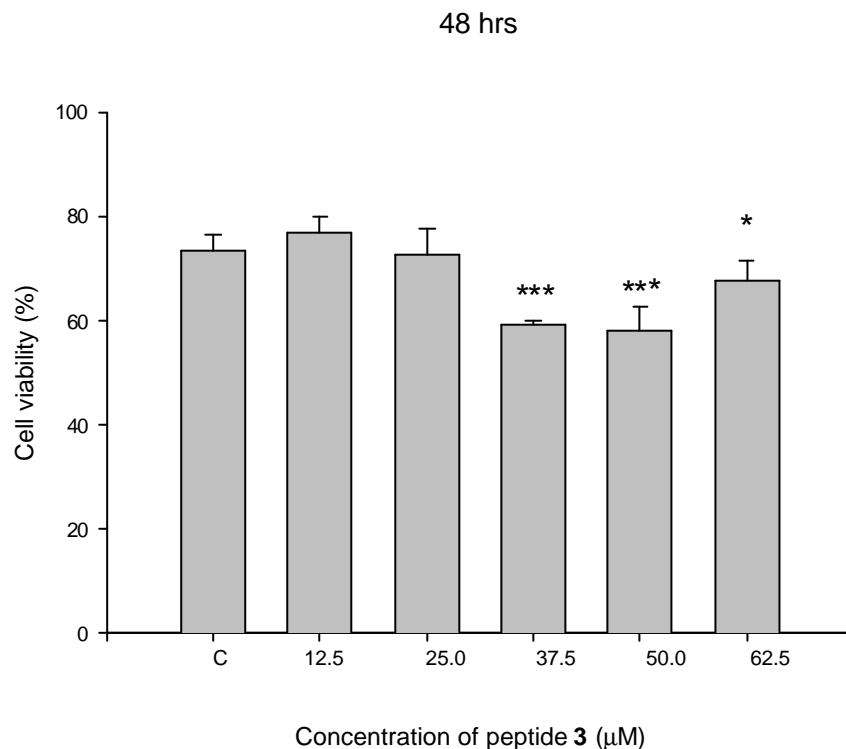


圖4-26、序列濃度的peptide 3處理人類乳癌細胞株MCF-7，48小時之細胞存活率變化的情形。人類乳癌細胞株MCF-7，經過48小時（圖B）之有無peptide 3處理（最終濃度為0、12.5、25.0、37.5、50.0、62.5μM）後，癌細胞存活率（%）

之變化。以sigmaplot軟體及student t-test統計分析，平均值 \pm 標準偏差 (n=3)。

*代表 $P < 0.05$ ；***代表 $P < 0.01$ 。

(B)

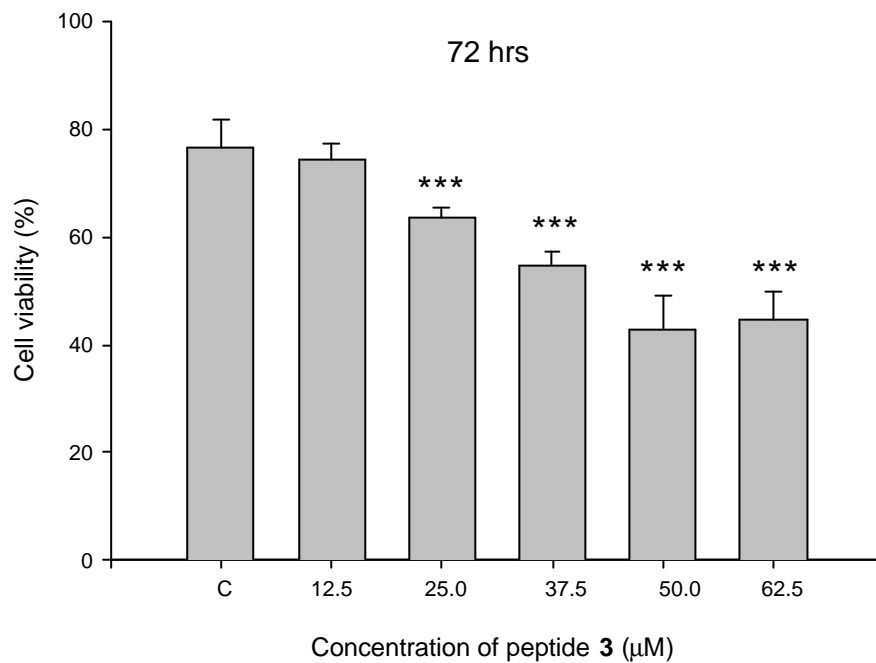


圖4-26、序列濃度的peptide 3處理人類乳癌細胞株MCF-7，72小時之細胞存活率變化的情形。人類乳癌細胞株MCF-7，經過72小時（圖B）之有無peptide 3處理（最終濃度為0、12.5、25.0、37.5、50.0、62.5 μM ）後，癌細胞存活率（%）之變化。以sigmaplot軟體及student t-test統計分析，平均值 \pm 標準偏差 (n=3)。*代表 $P < 0.05$ ；***代表 $P < 0.01$ 。

四、序列濃度之合成胜？對人類雌激素依賴型乳癌細胞株細胞週期之影響

序列濃度之 peptide 3 (最終濃度為 0、12.5、25.0、37.5、50.0、62.5 μ M) 加入於 6 孔洞平盤中，每孔含 MCF-7 細胞約 5×10^5 個，於 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的培養箱進行培養。經過 24 小時後利用流式細胞儀檢測乳癌細胞其細胞週期分佈情形之改變 (圖 4-27) 以 12.5 μ M peptide 3 處理 24 小時後，S 期即明顯下降；50.0 及 62.5 μ M peptide 3 處理 24 小時後，Apoptosis 分別增加 8% 及 17%，表示 Apoptosis 隨著濃度增加而上升。

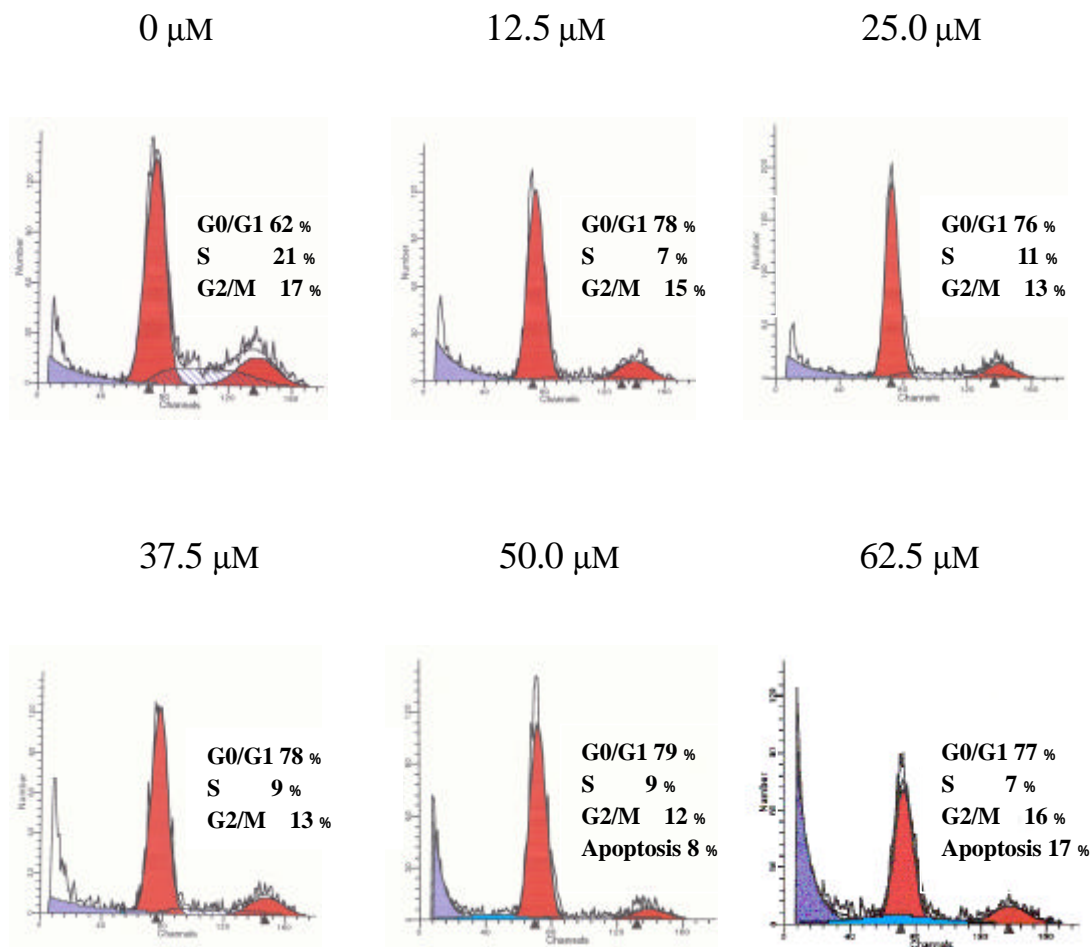


圖 4-27、序列濃度之 peptide 3 對人類雌激素依賴型乳癌細胞株細胞週期 24 小時之細胞週期變化的情形

第五章 結論

將天然食材--台南五號黑豆,依 0、0.15、0.31、0.62、1.25 毫克/毫升等濃度加入人類雌激素依賴型乳癌細胞(MCF-7),從實驗結果明顯可以看出,黑豆水提取物對 MCF-7 確實有降低其存活率的影響(圖 4-1),並有劑量(dose-dependent)及時間(time-dependent)的依存關係(圖 4-2)。再進一步的從細胞週期的變化,可一窺黑豆水提取物在 MCF-7 細胞週期的影響層面,推測黑豆水提取物的抑制作用,乃在於干擾了 DNA replication,使細胞週期停滯在 S phase,並從 S phase 直接導入 apoptosis (S phase-arrested undergo apoptosis)【94】。

之前許多人的研究指出大豆中的小分子胜? 具有抗癌效果【95】,另外也有報告指出,異黃酮用於抗癌有很高的成效【96、97】。由於本實驗中所用的台南五號黑豆,不僅富含小分子胜?,也富含異黃酮,因此從數據中得到的抗癌效果,尚無法定義是何種成分造成的效應,也因此進一步定量黑豆的蛋白質及異黃酮含量,下一步的努力目標,將分離黑豆漿成分,以確認其引起細胞凋亡的活性成分,並繼續深入探討黑豆水粗提取物產生抗癌效果之機制。

以致癌機轉設計胜?,根據表面膜漿共振技術建立之方法,篩選出與 Grb2 SH2 區塊具有高親和力及高專一性交互作用之胜? peptide 3 (結構組成為 Fmoc-E-Y-Aib-N-CONH₂),然後以此胜? 進行體外試驗。結果發現, 37.5 μ M 濃度的胜? 處理 MCF-7 48 小時,能明顯降低乳癌細胞存活率(圖 4-26)。此胜? 對 MCF-7 細胞株細胞週期之影響,以 12.5 μ M peptide 3 處理 24 小時後,S 期即明顯下降;50.0 及 62.5 μ M peptide 3 處理 24 小時後,Apoptosis 分別增加 8% 及 17%,表示 Apoptosis 隨著濃度增加而上升(圖 4-27)。合成胜?

? peptide 3 經過分析、質譜儀確認，是組成及結構明確的分子，且其結構屬於短胜，有分子小、易吸收的優點，從實驗數據得知其對乳癌細胞有抗癌作用，若進一步確認抗癌機制及安全性，則有開發成新藥的潛力。

參考文獻

1. Newbold RR, Jefferson WN, Padilla-Burgos E and Bullock BC. Uterine carcinoma in mice treated neonatally with Tamoxifen . *Carcinogenesis*. 1997; 18:2293–98
2. Baselga J, Norton L, Albanell J, Kim YM and Mendelsohn J. Recombinant humanized anti-HER2 antibody (Herceptin™) enhances the antitumor activity of paclitaxel and doxorubicin against HER2/ neuoverexpressing human breast cancer xenografts. *Cancer Res*.1998; 58:2825–31.
3. Skyles AJ and Sweet BV. Alternative therapies. *Wormwood*. *Am J Health Syst Pharm*. 2004; 61:239-42.
4. Ling X, Bernacki RJ, Brattain MG and Li F. Induction of survivin expression by taxol (paclitaxel) is an early event, which is independent of taxol-mediated G2/M arrest. *Biol Chem*. 2004; 279:15196-203.
5. Boerner JL, Danielsen AJ, Lovejoy CA, Wang Z, Juneja SC, Faupel-Badger JM, Darce JR and Maihle NJ. Grb2 regulation of the actin-based cytoskeleton is required for ligand-independent EGF receptor-mediated oncogenesis. *Oncogene*. 2003; 22:6679-89.
6. 劉涓、張東玄。1994。小分子藥物之免疫檢驗試劑。 *生物產業* 5: 35-37。
7. Yang PS, Yang TL, Liu CL, Wu CW and Shen CY. A case control study of breast cancer in Taiwan- a low incidence area. *Br J Cancer*. 1997; 75:752-6.
8. Offit K, Gilewski T, McGuire P, Schluger A, Hampel H, Brown K, Swensen J, Neuhausen S, Skolnick M, Norton L and Goldgar D. Germline BRCA1 185delAG mutations in Jewish women with breast cancer. *The Lancet*. 1996; 347: 1643-45.
9. 蘇顏洲，2003。乳癌患者治療成本效用與其生活品質之探討。中國醫藥學院醫務管理學研究所，碩士論文。
10. Lin SH, Peng HC and Chien YW. The contents and distributions of major isoflavones in commercial soy products. *Nutr Sci*. 2002; 27:139-146.
11. Liang TC. Black soybean in Taiwan. *Country Road*.1994; 20:54-6.
12. 張瑋，谷長任，楊永彬，王淑珍，王京花，張麗敏，馬波，王敏，崔麗華，倪江，1994。复方黑豆果油降低兔血脂作用的研究。哈爾濱醫科大學學報，第二十八卷第一期。
13. Iwai K, Nakaya N, Kawasaki Y and Matsue H. Antioxidative functions of natto, a kind of fermented soybeans: effect on LDL oxidation and lipid

- metabolism in cholesterol-fed rats. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*. 2002; 50:3597-601.
14. 張璋，王淑珍，王京花，楊永濱，張麗敏，谷長任，倪江，于祥志，杜德兵，劉國勇，1994。黑豆果油降血脂作用的實驗研究。哈爾濱醫科大學學報第二十八卷第五期。
 15. Iwai K, Nakaya N, Kawasaki Y and Matsue H. Inhibitory effect of natto, a kind of fermented soybeans, on LDL oxidation in vitro. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*. 2002; 50:3592-6.
 16. 謝鐘琪，1996。黑豆：抗衰佳品。醫藥與保健第 12 期。
 17. 連大進，游添榮，吳昭慧，2001。黑豆臺南 5 號之育成。行政院農業委員會臺南區農業改良場研究彙報 38: 1-19。
 18. Krenn L, Unterrieder I and Ruprechter R. Quantification of isoflavones in red clover by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*. 2002; 777:123–128.
 19. Sawyer T K, *Biopolymers*. 1998; 47, 243-261.
 20. Gay B, Furet P, Garcí'a-Echeverri'a C, Rahuel J, Che^ne P, Fretz H, Schoepfer J and Caravatti G. Dual Specificity of Src Homology 2 Domains for Phosphotyrosine Peptide Ligands. *Biochemistry*. 1997; 36, 5712-8.
 21. Rahuel J, Gay B, Erdmann D, Strauss A, Garcia-Echeverria C, Furet P, Garavatti G, Fretz H, Schoepfer J and Grutter MG. Structural basis for specificity of Grb2-SH2 revealed by a novel ligand binding mode. *Nature Struct. Biol*. 1996; 586–9.
 22. Skolnik, E. Y., Lee, C. H., Batzer, A., Vicentini, L. M., Zhou, M., Daly, R., Myers, M. J., Jr., Backer, J. M., Ullrich, A., White, M. F., *et al*. The SH2/SH3 domain-containing protein GRB2 interacts with tyrosine-phosphorylated IRS1 and Shc: Implications for insulin control of ras signalling. *EMBO J*. 1993; 12: 1929–36.
 23. Lung, F.-D.T., Tsai, J.-Y., Wei, S.-Y., Chen, C., Li, P., Roller, P. P. and Cheng, J.-W. Novel peptide inhibitors for Grb2 SH2 domain and their detection by surface plasmon resonance. *J. Peptide Res.*, 2002; 60: 143-9.
 24. Liedberg B, Nylander C and Lundström I. Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing. *Sensors and Actuators*. 1983; 4, 299 – 304.
 25. Scheller F, Schubert F, Pfeiffer D, Hintsche R, Dransfeld I, Renneberg R, Wollenberger U, Riedel K, Pavlova M and Kuhn M. Research and development of biosensors. A review. *Analyst*. 1989; 114:653-62.

26. Fagerstam LG, Frostell-Karlesson, Persson B and Ronnberg I. Biospecific interaction analysis using surface plasmon resonance detection applied to kinetic, binding site and concentration analysis. *Journal of Chromatography* 1992; 597:397-410.
27. BIA technology handbook, edition June 1994.
28. Thompson NL and Lagerholm BC. Total internal reflection fluorescence applications in cellular biophysics. *Curr. Opin. Biotechnol.* 1997; 5:58-64.
29. Stenberg E, Persson B, Root H and Urbanuczky C. Quantitative determination of surface concentration of protein with surface plasmon resonance using radiolabeled protein. *Journal of colloid and interface science.*1991; 143:513-26.
30. Malmqvist M. Biospecific interaction analysis using biosensor technology. *Nature.*1993 ; 361:186-7.
31. Johne B, Gadnell M and Hansen K. Epitope mapping and binding of monoclonal antibodies studied by real time biospecific interaction analysis using surface plasmon resonance. *Journal of immunological methods.*1993; 160: 191-8.
32. Volpi D and Ballinari D. BIA technology for new anticancer drug discovery. *BIA journal.* 1997; 15-16.
33. Cunningham BC and Wells JA. Comparison of structural and a functional epitope. *Journal Molecular Biochemistry.* 1993; 234:554-63.
34. Bartley TD, Hunt RW and Fox GM. B61 is a ligand for the ECK receptor protein-tyrosine kinase. *Nature.* 1994; 368:558-60.
35. Stenhag K, Nilsson P, Larsson A and Uhlen M. Detections of oligonucleotide probe affinities using surface plasmon resonance:A means for mutational scanning. *Biochemistry.* 1997; 246:34-44.
36. Karlsson R, Fagerstam L, Nilshans H and Persson. Analysis of active antibody concentration. Separation of affinity and concentration parameters.*Journal of immunological Methods.*1993; 166:75-84.
37. Lofas S and Johnsson B. A novel hydrogel Matrix on gold surfaces in surface plasmon resonance sensors for fast and efficiene covalent immobilization of ligand. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1990; 21:126-1528.
38. BIA applications handbook, edition June 1994.
39. Albericio, F.; Kenib-Cordonnier, N.; Biancalana, S.; Gera, L.; Masada, R. I.; Hud son, D.; Barany, G. Prep a ra tion and ap pli ca tion of the 5-(4-(9-Fluorenylmethyloxycarbonyl)-amino-methyl-3,5-dimethoxyphenoxy)-

- valeric Acid(PAL) han dle for the solid-phase synthesis of C-terminal pep tide amides un der mild con ditions. *J. Org. Chem.* 1990; 55, 3730-43.
40. Melamed MR, Lindmo T, Mendelsohn ML (eds): *Flow Cytometry and Sorting*. Wiley-Liss, New York, 1990.
 41. Shah MA and Schwartz GK. Cell cycle-mediated drug resistance: an emerging concept in cancer therapy. *Clin Cancer Res.* 2001; 7:2168-81.
 42. Smith ML and Fornace AJ Jr. Mammalian DNA damage-inducible genes associated with growth arrest and apoptosis. *Mutation Research.* 1996; 340:109-24.
 43. Sherr CJ. G1 phase progression: cycling on cue. *Cell.* 1994; 79:551-5.
 44. Draetta GF. Mammalian G1 cyclins. *Current Opinion in Cell Biology.* 1994; 6:842-6.
 45. Hunter T and Pines J. Cyclins and cancer. II: Cyclin D and CDK inhibitors come of age *Cell.* 1994; 79:573-82.
 46. King RW, Jackson PK and Kirschner MW. Mitosis in transition *Cell.* 1994; 79:563-71.
 47. Reed SI, Bailly E, Dulic V, Hengst L, Resnitzky D and Slingerland J. G1 control in mammalian cells. *Journal of Cell Science - Supplement.* 1994; 18:69-73.
 48. Brooks R, Fantes P, Hunt T and Wheatley D. eds. *The cell cycle*. Cambridge: The Company of Biologists Ltd, 1989.
 49. Hutchison C and Glover DM. *Cell cycle control*. New York: Oxford University Press. 1995.
 50. Tyson JJ, Novak B, Odell GM, Chen K and Thron CD. Chemical kinetic theory: understanding cell-cycle regulation. *TIBS.* 1996; 21: 89-95.
 51. McGill CJ and Brooks G. Cell cycle control mechanisms and their role in cardiac growth. *Cardiovasc. Res.* 1995; 30: 557-69.
 52. Martinez AM, Afshar M, Martin F, Cavadore JC, Labbé JC and Dorée M. Dual phosphorylation of the T-loop in cdk7: its role in controlling cyclin H binding and CAK activity. *EMBO J.* 1997; 16: 343-354.
 53. Andersen G, Busso D, Poterszman A, Hwang JR, Wurtz JM, Ripp R, Thierry JC, Egly JM and Moras D. The structure of cyclin H: common mode of kinase activation and specific features. *EMBO. J.* 1997; 16: 958-967.
 54. Li JM and Brooks G. Cell cycle regulatory molecules (cyclins, cyclin-dependent kinases and cyclin-dependent kinase inhibitors) and the cardiovascular system. *Eur. Heart J.* 1999; 20: 406-420.

55. Pines J. Cyclin-dependent kinase inhibitors: the age of crystals. *Biochem. Biophys. Acta.* 1997; 1332: M39-M42.
56. Brooks G, Poolman RA, and Li JM. Arresting developments in the cardiac myocyte cell cycle: Role of cyclin- dependents kinase inhibitors. *Cardiovasc. Res.* 1998; 39: 301-311.
57. Adrian M. Senderowicz, Edward A. Sausville Preclinical and Clinical Development of Cyclin-Dependent Kinase Modulators. *Journal of the National Cancer Institute.* 2000; 92: 376-387.
58. Kerr JF, Wyllie AH and Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics *Br J Cancer.*1972; 26: 239-57.
59. Lockshin RA and Beaulaton J. Programmed cell death *Life Sci.* 1974; 15: 1549-65.
60. Zakeri Z and Lockshin RA. Physiological cell death during development and its relationship to aging *Ann N Y Acad Sci.* 1994; 719: 212-29.
61. Ishizaki Y. Physiological functions of programmed cell death *Seikagaku.* 1998; 70: 365-70.
62. Reed JC. Mechanisms of apoptosis avoidance in cancer *Curr Opin Oncol.* 1999; 11: 68-75.
63. Behl C. Apoptosis and Alzheimer's disease. *J Neural Transm.* 2000; 107: 1325-44.
64. Cotman CW, Whittemore ER, Watt JA, Anderson AJ and Loo DT. Possible role of apoptosis in Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci.* 1994; 747: 36-49.
65. Cotman CW and Anderson AJ. A potential role for apoptosis in neurodegeneration and Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol.* 1995; 10: 19-45.
66. Perry G, Nunomura A, Lucassen P, Lassmann H and Smith MA. Apoptosis and Alzheimer's disease. *Science.* 1998; 282: 1268-9.
67. Searle J, Kerr JF, and Bishop CJ. Necrosis and apoptosis: distinct modes of cell death with fundamentally different significance, *Pathol Annu.* 1982; 17: 229-59.
68. Matsuda H, Strebel FR, Kaneko T, Stephens LC, Danhauser LL, Jenkins GN, Toyota N and Bull JM. Apoptosis and necrosis occurring during different stages of primary and metastatic tumor growth of a rat mammary adenocarcinoma. *Anticancer Res.* 1996; 16: 1117-21.

69. Nicotera P, Leist M and Ferrando-May E. Apoptosis and necrosis: different execution of the same death. *Biochem Soc Symp.* 1999; 66: 69-73.
70. Andrew Wyllie et al, *Apoptosis and Cell Proliferation* 2nd edition pp.2 1998 Boehringer Mannheim.
71. Zhang JH and Xu M. DNA fragmentation in apoptosis, *Cell Res.* 2000; 10: 205-11.
72. Kameda K, Kondo T, Tanabe K, Zhao QL and Seto H. The role of intracellular Ca²⁺ in apoptosis induced by hyperthermia and its enhancement by verapamil in U937 cells. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2001; 49: 1369-79.
73. Saleh H, Schlatter E, Lang D, Pauels HG and Heidenreich S. Regulation of mesangial cell apoptosis and proliferation by intracellular Ca²⁺ signals. *Kidney Int.* 2000; 58: 1876-84.
74. Miller DK. The role of the Caspase family of cysteine proteases in apoptosis, *Semin Immunol.* 1997; 9: 35-49.
75. Kuida K. Caspase family proteases and apoptosis], *Tanpakushitsu Kakusan Koso.* 1997; 42: 1630-6.
76. Shi Y. Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Molecular Cell.* 2002; 9, 459-470.
77. Zornig M, Hueber AO and Evan G, Apoptosis regulators and their role in tumorigenesis. *Biochemica et Biophysica Acta.* 2001; 1551, F1-F37.
78. Leonhard M, Gruber P, Chott PA. Mutations in apoptosis genes: a pathogenetic factor for human disease. *Mutation Research.* 2001; 488, 211-231.
79. Lundberg AS and Weinberg RA. Control of the cell cycle and apoptosis, *Eur J Cancer.* 1999; 35: 1886-94.
80. McDonnell TJ, Beham A, Sarkiss M, Andersen MM and Lo P. Importance of the Bcl-2 family in cell death regulation, *Experientia.* 1996; 52: 1008-17.
81. Ibrado AM, Huang Y, Fang G, Liu L and Bhalla K. Overexpression of Bcl-2 or Bcl-xL inhibits Ara-C-induced CPP32/Yama protease activity and apoptosis of human acute myelogenous leukemia HL- 60 cells. *Cancer Res.* 1996; 56: 4743-8.
82. Han Z, Chatterjee D, Early J, Pantazis P, Hendrickson EA and Wyche J. H. Isolation and characterization of an apoptosis-resistant variant of human leukemia HL-60 cells that has switched expression from Bcl-2 to Bcl-xL. *Cancer Res.* 1996; 56: 1621-8.

83. Reed JC. Regulation of apoptosis by bcl-2 family proteins and its role in cancer and chemoresistance. *Curr Opin Oncol.* 1995; 7: 541-6.
84. Reed JC. Bcl-2 family proteins: regulators of chemoresistance in cancer. *Toxicol Lett.* 1995; 82-83: 155-8.
85. Reed JC. Double identity for proteins of the Bcl-2 family. *Nature.* 1997; 387: 773-6.
86. Ryan KM and Birnie GD. Myc oncogenes: the enigmatic family. *Biochem J.* 1996; 314: 713-21.
87. Lee WM. The myc family of nuclear proto-oncogenes. *Cancer Treat Res.* 1989; 47: 37-71.
88. Alt FW, DePinho R, Zimmerman K, Legouy E, Hatton K, Ferrier P, Tesfaye A, Yancopoulos G and Nisen P. The human myc gene family. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1986; 51: 931-41.
89. Gross N, Balmas K, Beretta Brognara C, and Tschopp J. Expression of Fas (APO-1/CD95) and Fas ligand (FasL) in human neuroblastoma. *Med Pediatr Oncol.* 2001; 36: 111-4.
90. Hartmann K, Wagelie-Steffen AL, von Stebut E, and Metcalfe DD. Fas (CD95, APO-1) antigen expression and function in murine mast cells. *J Immunol.* 1997; 159: 4006-14.
91. Robertson MJ, Manley TJ, Pichert G, Cameron C, Cochran KJ, Levine H and Ritz J. Functional consequences of APO-1/Fas (CD95) antigen expression by normal and neoplastic hematopoietic cells. *Leuk Lymphoma.* 1995; 17: 51-61.
92. Carpino LA and Han GY. The Fluorenylmethoxycarbonyl Amino Protecting Group. *J. Org. Chem.* 1972; 37: 3404-9.
93. Webb AR, Pilbeam C, Anafin HN, Holick M. An evaluation of the relative contribution of exposure to sunlight and of diet of the circulating concentration of 25-hydroxy-vitamin D in an elderly nursing home population in Boston. *Am. J. Clin. Nutr.* 1990; 51:1075-81.
94. Meikrantz W, Gisselbrecht S, Tam SW and Schlegel R. Activation of cyclin A-dependent protein kinase during apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1994; 3754-8.
95. Galvez AF, Chen N, Macasieb J and de Lumen BO. Chemopreventive property of a soybean peptide (Lunasin) that binds to deacetylated histones and inhibits acetylation. *Cancer Research.* 2001; 61: 7473-8.

96. Lee MM, Gomez SL, Chang JS, Wey M, Wang RT, Hsing AW. Soy and isoflavone consumption in relation to prostate cancer risk in China. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2003; 12:665-8.
97. Kamsteeg M, Rutherford T, Sapi E, Hanczaruk B, Shahabi S, Flick M, Brown D, Mor G. Phenoxodiol--an isoflavone analog--induces apoptosis in chemoresistant ovarian cancer cells. *Oncogene.* 2003; 22:2611-20.