

國立暨南國際大學資訊管理研究所

碩士論文

混合式生物反應路徑的物件導向模擬環境：以細胞
凋亡為例

An Object Oriented Simulation Environment for
Hybrid Biopathways : A Case Study from
Apoptosis

指導教授：俞旭昇 博士

研究生：王書楠

中華民國九十七年六月

論文名稱：混合式生物反應路徑的物件導向模擬環境：以細胞凋亡為例

校院系：國立暨南大學資訊管理研究所

頁數：70

畢業時間：中華民國九十七年七月

學位別：研究生

研究生：王書楠

指導教授：俞旭昇 博士

論文摘要

實驗科學有其不可行的限制，若能透過對生命現象機制的瞭解，建立適當的生物路徑模型，找出調控法則，就能降低生物、醫學、藥物學...等研發成本。然而，現有的模擬模型不下數十種，若欲用來模擬二種及其以上的混合式生物反應路徑（基因網路、代謝路徑以及信號傳導路徑），一個缺點是建立模型時，必須找到所有的實驗數據，才可以建立完整的模型；一個缺點是擴充系統模型時，必須重新推算系統參數。所以，本研究提出混合初始化轉置、Petri Net、化學平衡解與酵素動力學等四種計算物件於一體的系統模型，就能以最少的計算物件，較完整地模擬出混合式的生物反應路徑。

本研究採用 java 的物件導向系統為模擬工具，以 Petri Net 為基礎計算物件，其他計算物件皆繼承 Petri Net 而來。Petri Net 除具有正規的數學表示法外，更增添圖形化的模擬功能，可以讓使用者以直觀方式描述系統調控的因果關係。酵素動力學是最早用來建立生物路徑的模式，使用微分方程來計算基質濃度、平衡常數以及反應速率等動力學參數。至於化學平衡解，則採用二分逼近法不斷逼近反應式的平衡常數，能夠自動判別生物反應是否繼續進行，所以反應計算所花費的時間較酵素動力學來的少。

系統模擬驗證方面，本研究實作 Fas 誘發的細胞凋亡信號傳導路徑，發現單一 Petri Net 無法正確模擬生物路徑，套用本四種計算物件即可真實反應混合了三種路徑元素的細胞凋亡信號傳導路徑。

關鍵詞：生物反應路徑、細胞凋亡、模擬

Title of Thesis : An Object Oriented Simulation Environment for Hybrid Biopathways : A
Case Study from Apoptosis

Name of Institute : National Chi Nan University, Pages : 70

Institute of Information Management

Graduation Time : 07/2008 Degree Conferred : Master

Student Name : Shu-Nan Wang Advisor Name : Shiuh-Sheng Yu

Abstract :

Biological pathways are complex bio-reaction networks used by systems biologists to study biological phenomena and research on Biology, Medical Science and Pharmacology. They were classified as three categories, namely gene network, metabolism pathway and signaling pathway. There are tens of existing models for biological pathways, but none can precisely describe a biological pathway with all three categories. A simulation environment with the ability to mix different models is the key for systems biology.

This paper proposes using object-oriented technology to mix four different models for biological pathways, namely initial transition, Petri Net, chemical equilibrium and Michaelis-Menton kinetics. A case study on Fas-induced apoptosis shows our proposal can correctly trigger all four legal paths, compared with previous studies which trigger only two paths.

Key words : biological pathways, apoptosis, simulation

目錄

第一章	序論.....	1
1.1	研究動機.....	1
1.2	研究目的.....	2
1.3	研究範圍.....	2
1.4	研究架構.....	2
第二章	文獻探討.....	3
2.1	系統生物學.....	3
2.2	生物反應路徑.....	4
2.2.1	基因網路.....	4
2.2.2	代謝路徑.....	8
2.2.3	信號傳導路徑.....	9
2.2.4	醫藥代謝路徑.....	11
2.3	細胞凋亡.....	13
2.3.1	細胞死亡現象之分類.....	13
2.3.2	細胞凋亡之生化形態特徵.....	15
2.3.3	細胞凋亡之功能.....	15
2.3.4	細胞凋亡之過程.....	16
2.3.5	誘發細胞凋亡之因子.....	16
2.4	建模之模式.....	18
2.5	Petri Net.....	21
2.5.1	Petri Net 之基本定義.....	21
2.5.2	Petri Net 之圖形表示法.....	22
2.5.3	Petri Net 之數學表示法.....	23
2.5.4	Petri Net 之分類.....	24
2.5.5	Petri Net 之迷思.....	26
2.6	生物反應類型.....	28

2.6.1	初始化反應.....	28
2.6.2	結合反應.....	28
2.6.3	同二聚反應.....	29
2.6.4	易位反應.....	30
2.6.5	分解反應.....	30
2.6.6	化學反應.....	31
2.6.7	酵素化反應.....	32
第三章	系統模型.....	34
3.1	混合式生物反應路徑之模擬.....	34
3.2	系統之計算物件.....	35
3.2.1	初始化轉置.....	35
3.2.2	Petri Net.....	36
3.2.3	化學平衡解.....	36
3.2.4	酵素動力學.....	37
3.2.4	計算物件之比較.....	38
第四章	模擬與實作.....	43
4.1	資料庫表格之建立.....	43
4.2	Fas 誘發細胞凋亡之信號傳導路徑模擬.....	46
4.3	參數設定.....	51
4.4	模擬結果.....	54
4.4.1	Fas ligand 誘發細胞凋亡之信號傳導路徑.....	54
4.4.2	細胞凋亡多重路徑之模擬結果.....	56
第五章	結論與未來方向.....	61
5.1	結論.....	61
5.2	未來方向與展望.....	62
參考文獻	63
附錄一	縮寫對照表.....	70

圖目錄

圖 1	細胞解剖圖	5
圖 2	DNA 轉譯成蛋白質過程	6
圖 3	各蛋白質合成階段的基因表現調控	7
圖 4	細胞凋亡路徑圖。箭頭代表信號路徑方向，虛線箭頭表示間接反應。..	17
圖 5	基因網路模擬之模型	19
圖 6	代謝路徑模擬之模式	19
圖 7	信號傳導模擬之模型	20
圖 8	Petri Net 用於建模、分析與修正系統	21
圖 9	化學式反應前狀態	23
圖 10	化學式反應後狀態	23
圖 11	初始化反應	28
圖 12	結合反應	29
圖 13	同二聚作用	30
圖 14	易位反應	30
圖 15	分解反應	31
圖 16	化學反應	32
圖 17	酵素化反應	33
圖 18	Transition 繼承圖	35
圖 19	細胞凋亡之 Fas 信號傳導路徑	42
圖 20	Fas ligand 及 DNA Fragment 模擬之結果	55
圖 21	Caspase 家族模擬之結果	56
圖 22	無資源搶奪之多重路徑選擇	57
圖 23	DISC 多重路徑選擇之結果	59
圖 24	Proaspase-8 多重路徑選擇結果	60

表目錄

表格 1	醫藥代謝路徑之應用	12
表格 2	細胞凋亡與壞死之比較	13
表格 3	四種計算物件之比較	39
表格 4	各轉置之生物意義詮釋	46
表格 5	Time Petri Net 模型中假設之細胞凋亡射線權重值	51
表格 6	初始化反應給予輸出位置之預設代幣值	52
表格 7	Time Petri Net 模型中假設之轉置延遲時間	53

第一章 序論

1.1 研究動機

系統生物學(Systems biology)自 2001 年發展以來，排除化約論(reductionism)方式，試圖以全系統觀點，整合不同層次信息，以理解生物系統如何行使其分子功能，是一門新興的學術領域。這些專家學者透過對生命現象機轉(mechanism)的瞭解，建立完整的系統模型，縮小從基因到蛋白質的研究範圍，以找出調控路徑。

生物系統模型的建立，其參數數據資料通常取決於實驗數據之上，但實驗科學有其不可行的限制處，例如：核子實驗之後果嚴重不可行；人體實驗之道德良心不可行；AIDS 新藥研發之時效不可行...等等。幸得現今資訊軟硬體發展神速，得以經由網際網路存取世界各地之專業資料庫，進一步做資料探勘、分析、與應用。例如：

- (一) 個人醫療：建立個人之遺傳、代謝、生化檢測等資料庫，以模擬專屬的個別藥物反應；
- (二) 體質研究：測試相同藥物投予不同生物體，所引發的效果反應；
- (三) 舊藥新用：以分子生物學特性，分析藥物組成資料庫，探勘可能用藥，以節省藥物開發成本與時效；
- (四) 複方療效分析：解析不同藥物組合，在不同時間點，對生物路徑網路的影響；
- (五) 藥靶辨識(target identification)、治療標的確認(target validation)：探勘藥物成分之化學物質，在生物路徑網路的關鍵性作用或新路徑。
- (六) 機轉研究：瞭解啟動或停止信號傳遞機制，所造成的生物網路變遷；

以上凡此種種，人工作業必不可行，運用電腦的計算能力來解決，倒不失為模擬良器。然而，利用電腦模擬分析任一生物系統時，建模的正確性是分析使用模型的關鍵步驟。而當前模擬系統通常以單一演算法(例如：Petri Net)或單一模式(例如：反應動力學)來建立模型，當生物模擬系統有其擴充的必要時，將發生擴充系

統困難、或合併路徑困難...等缺乏彈性的問題。此外專家學者建立系統模型時，通常抱持著自我需求及目的地，當實驗數據不足，必須取捨重要與否的抉擇時，能否提供適當的解決之道亦是本篇研究探討的動機所在。

1.2 研究目的

可供研究的生物反應路徑繁多，而專家學者們又各依其研究目的提出數十種相對應之模擬模型，為減少建模模型之學習與取捨，本研究以尋找最少種類之 Transition 計算物件，供模擬混合式生物反應路徑之用，並找出各別 Transition 所適用的生物反應路徑為目的。期望此一研究能提供生化學家另一模擬建模的選擇。

1.3 研究範圍

本研究以系統生物學(Systems biology)角度切入，研究混合式生物反應路徑之最少計算物件種類，並探討細胞凋亡(apoptosis)機制。將外來誘發因子 Fas 所誘發的凋亡信號傳導，以 Petri Net 為基礎計算物件，搭配所繼承的初始化轉置、化學平衡解以及酵素動力學等計算物件，實際模擬出生物反應路徑(Biological Pathways)應有的分子互動，並以文獻[29]之數據，驗證混合式生物反應路徑之物件導向模擬環境之可行。

1.4 研究架構

首先，本研究於第二章先探討文獻中各專有名詞內容，接下來，第三章闡述生物反應路徑模擬的細胞凋亡系統模型，最後，第四章將以文獻[29]資料進行驗證與改善工作。

第二章 文獻探討

2.1 系統生物學

數百年來支持化約論的學者認為，複雜的系統可以分割成不互相干擾的子系統，由子系統著手，無限化約，就能解釋生命的現象。但是，個別生命現象或生物功能表現，無法歸因於一個分子，而是來自於龐雜組成物之間的交互作用。故 1999 年美國科學家胡德提出系統生物學(Systems biology)，並將之定義為研究一個生物系統中所有組成分(基因、mRNA、蛋白質等)的構成，以及在特定條件下這些組成分之間相互關係的一門學科。為了得到一個儘可能接近真實生物系統的理論模型，以數學及計算機科學建模的過程，貫穿研究的每一階段。

與傳統只關心個別基因和蛋白質的實驗生物學不同，系統生物學更注重組成份之間的關係和交互作用，並利用計算生物學以及生物資訊學等數理工程領域的研究方法，將量化的實驗證據轉化成物理科學般有數學模型的理論，以解釋所觀測到的生物現象，甚至進一步預測可能發生的生物功能、表型和行為反應。所以，這是一門需要生物、物理、化學、工程、數學、醫學、電腦等領域的專業人才，共同努力合作的整合性學科，是可以廣泛應用到生物多樣性、生理、內分泌、神經、生態、基因體、農業、生化工程、生物技術、醫學及其他綜合性領域的學科。

系統生物學是一門試圖整合不同層次信息，以理解生物系統如何行使功能的新興學術領域。透過研究生物系統各相異部位之間的相互關係及作用(例如：信號傳導、代謝網路、胞器、細胞等生理系統，或生物相關的基因、蛋白質網路)，系統生物學家期望建立可理解的完整系統模型，其目的即為了瞭解所觀測到的生命現象背後的機轉(mechanism)，以實際應用於生物系統運作的研究、瞭解病毒與身體免疫系統的抗爭過程、甚至模擬藥物成份對疾病與身體的影響，以節省新藥開發的費用，找出治病良方。換言之，系統生物學不只可應用於建構已知生物反應路徑在不同藥物組合下的交互作用；亦可建構未知的生物反應路徑。

2.2 生物反應路徑

將實際生物反應網路的過程，以不同形狀和箭號整合在同一張網圖中，以反映所知的生物事實印象，即為生物反應路徑(Biological Pathways)。生物路徑之間各具關聯性，彼此相連即可形成一個複雜的生物路徑網路，而這網路之間的交互作用，即為系統生物學家探究生命起源的研究重點。若能將生物的研究範圍由單一的基因和蛋白質層次，擴大至彼此交互作用的網路層次，找出調控路徑，就能更準確地診斷並預測疾病的發展。不致於讓細胞於生長分化過程中，被改變或失調其生物路徑，產生病變或突變現象。

雖然根據生物路徑聯盟(BioPathways Consortium¹)的分類，生物反應調控路徑可分為以下四大類：

- (一) 基因網路(Genetic networks)；
- (二) 代謝路徑(metabolic pathways)；
- (三) 信號傳導路徑(signaling transduction pathways)；
- (四) 醫藥代謝路徑(medicine metabolic pathways)；

不過，嚴格說來，第四類的醫藥代謝路徑，可說是前三者的主要應用，大部份的文獻(例如：[34])，只將生物反應路徑分為基因調控網路、代謝路徑與信號傳導路徑等三大類。

2.2.1 基因網路

生命運作的訊息被編成一連串的核苷酸密碼(基因)，而解碼過程則由蛋白質進行，編碼和解碼共同造就生物的存在。以下圖 1 是將細菌(Bacterium)細胞與動物細胞放大 1 萬倍的顯示圖。動物細胞的細胞膜內擁有一個被細胞質(cytoplasm)圍繞的細胞核(Nucleus)，核內包含大部份的 DNA，而絕大多數的細胞主動過程即

¹ 生物路徑聯盟：<http://www.biopathways.org>

發生於此。核膜連接著內質網(Endoplasmic reticulum)，而內質網又連接著高爾基氏體(Golgi bodies)。除此之外，細胞膜內尚包括體積大小同於細菌且 號稱細胞發電機的粒腺體(Mitochondrion)、轉譯機器的核糖體(Ribosomes)以及微粒體(Vesicle)等。DNA 的訊息經由轉錄作用形成 RNA，RNA 再將其轉譯成有執行功能的蛋白質，此為一種細胞個體由內而外的訊息傳遞過程。而站在細胞集體行動立場，細胞表面的受器蛋白，接受來自激素荷爾蒙分子或蛋白質分子的特殊信號，隨後啟動信號的機制，是本研究探討的信號傳導過程。

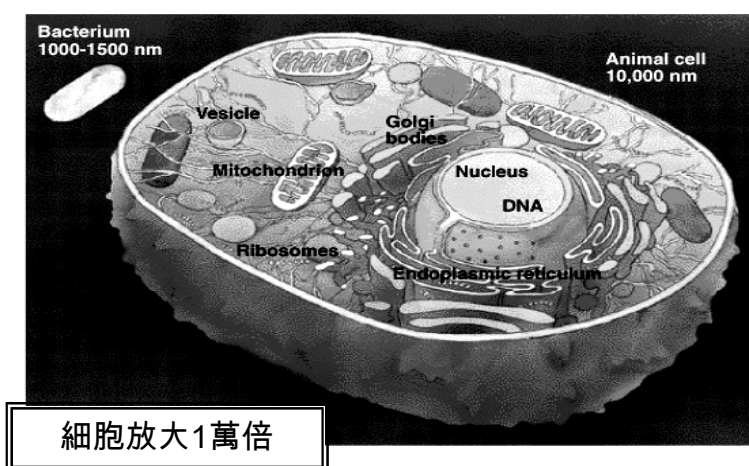


圖 1 細胞解剖圖

資料來源：www.jbpub.com/connections

蛋白質是 DNA 建構核苷酸(Nucleotides)序列的訊息傳遞終點，而此一訊息以單向反應流轉，蛋白質無法再回傳訊息給 DNA。以圖 2 解釋之，綠色球體代表細胞核，而置於其中的彩色雙螺旋長鏈分子則為 DNA。DNA 是一組需要依特定順序執行的指令，所以可將其視為一張食譜而非一張藍圖，因為藍圖通常包含最終產物的影像或縮尺模型，而 DNA 卻只發出“拿這個、加那個、停、再加拿這個...”等類似的訊息口令。為了不使 DNA 冒移動的風險，首先，細胞將基因內的核苷酸(Nucleotides)序列進行複製轉錄(Transcription)，製造出既可代表基因(Gene)；又可用完即丟的單股 DNA 複本，亦即紫色線條狀的傳訊 RNA (mRNA)。然後，紫色

扭曲狀的轉移者 RNA(tRNA)於細胞質處，將胺基酸(Amino acid)裝配於其上的小 RNA 轉接頭(Adaptor)上。換言之，每一轉接頭皆可辨識一組由三聯碼核苷酸組成的密碼，是 tRNA 與胺基酸接合之處，而 tRNA 則是訊息與蛋白質之間轉譯(Translation)解碼的關鍵單位。最後，右下角的核糖體解讀 mRNA 的密碼子訊息，並藉由 tRNA 的轉接頭，將正確的胺基酸配對串連起來，就製成完整的蛋白質長鏈。

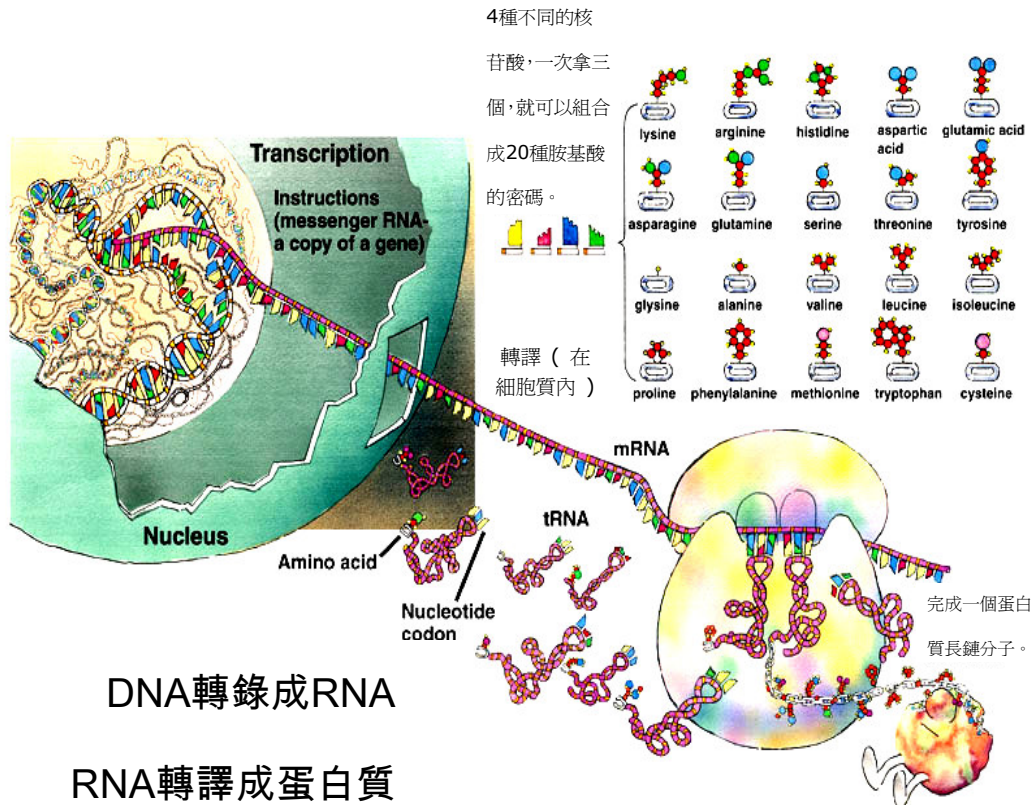


圖 2 DNA 轉譯成蛋白質過程
資料來源：www.jbpub.com/connections

由 DNA 轉錄(Transcription)成 RNA 再轉譯(Translation)成蛋白質的基因(Gene)表現過程中，最早被解讀的基因次序是病毒基因，但是直自 1961 年 Jacob 和 Monod 提出操縱元(Operon)學說[20]後，才打開認識基因表現調控的視窗。其後，60 年代，專家學者研究出原核生物基因表現的調控機制，70 年代，發現猴病毒和腺

病毒中，普遍存在的基因序列，因而揭開真核基因組結構和調控序幕。至 1997 年止，已有超過 4300 個大腸桿菌(E. coli)的基因被學者們發現。而 2002 年，甚至有人發表老鼠的基因組排序。

科學家明白核苷酸(Nucleotides)次序排列的使用方法後，就可以瞭解蛋白質、RNA 產物與健康、疾病之間的關係。這對於預防或治療癌症、心血管疾病、糖尿病、多重硬化症、阿茲海默症等遺傳疾病，有極大助益。另一方面，透過基因序列的調控，還可以複製核苷酸的遺傳訊息、修復或突變核酸資訊、調控基因表現、甚至應用基因工程技術，改良農作物的營養價值或抗病能力。以下圖 3 顯示從 DNA 轉譯成蛋白質的各階段過程中，可供調控的機制。

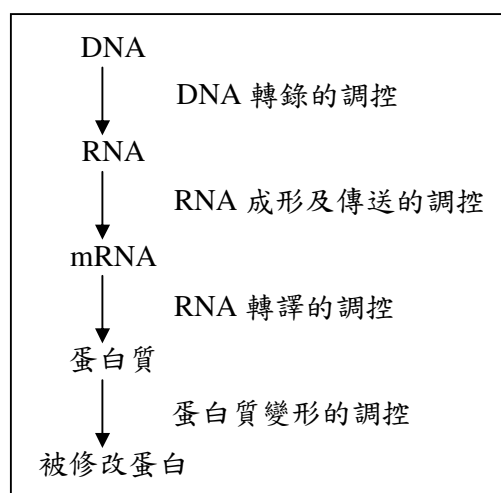


圖 3 各蛋白質合成階段的基因表現調控

資料來源：Hidde de Jong, 2002

至於模型模擬，Jacob 等人[20]，以大腸桿菌乳糖操縱(lac operon)機制，獲得 1965 年的諾貝爾獎。Matsuno 等人，於 2003 年[35]以 Hybrid Functional Petri Net 模擬果蠅的生理節律，3 年後，比較果蠅(fruit fly)與哺乳動物(mammalian)的晝夜調節(circadian rhythms)基因機制[34] [33]，發現一條尚未被生物學家確認的哺乳動物互動路徑。至於癌症基因調控機制，Doi 等人[7]，也曾於 2006 年成功模擬 p53 轉譯活性的系統。

2.2.2 代謝路徑

代謝網路本質上是一連串由酵素(enzyme)所催化(catalyze)的化學反應，其結果不是以代謝產物的形式呈現，就是成為其他代謝路徑的起始點。以圖形的觀點來描述一系列酵素所執行的連續性任務，提高具備催化功能蛋白質(酵素)的效率(例如：酵素活性之調控、賀爾蒙之調控、或者基因表現之調控)，將有助於專家學者對複雜病症的研究。

早在 1993 年，第一個以普通 Petri Net 來模擬生物路徑的代謝路徑，就曾被提出研究[45][17]。當時，將代謝物(metabolite)視為一個位置(place)，反應式(reaction)視為一個轉置(transition)，位置內含的代幣(token)數表示條件、信號或資源的數量，而參與代謝路徑的反應物及產物，其化學反應係數則視為射線(arc)權重(weight)。倘若所套用的 Petri Net 是沒有自我迴路的模型，則其關聯矩陣會符合化學計量矩陣。以上這些代謝網路路徑的定義，被其後的研究人員視為標準樣本。例如，2004 年，Heiner 等人[14]於文獻中驗證多種以 Petri Net 模型建模完成之生物反應路徑，包括馬鈴薯的碳代謝(Carbon Metabolism in Potato Tuber)；醣酵解和戊醣磷酸鹽代謝(Glycolysis and Pentose Phosphate Metabolism)等。2005 年，蔡劍霞[66]以系統生物學觀點修正 Petri Nets 並應用於代謝網路，建置並模擬出醣酵解(glycolytic)代謝生物路徑。

除了 Petri Net 外，傳統上，使用數學的代數和微分方程方法來做為建模的工具。例如：1998 年後 Stephanopoulos 等人[52]提出生化反應中不同分支的通量(flux)，可以藉由代謝平衡來決定的觀念，隔年，Zeveni-Oancea 等人[50][61]提出分析代謝網路的通量反應基礎模型(elementary flux mode)，2001 年也有 Ramakrishna 等學者[44]使用通量平衡分析(flux balance analysis, FBA)來描述粒腺體中 ATP 最大產量的最佳分佈特性。不過，至 2003 年為止，Zeveni-Oancea 等人[61]發現，他們

所提的反應基礎模型，可以應用於 Petri Net 的 P 不變量(invariant)與 T 不變量觀念，同時揭露出代謝網路路徑具有陷阱(traps)、虹吸(siphon)、活轉性(liveness)與死結(deadlock)等特性。所謂陷阱是指生物體處於生長期時，所有位置的集合，必須穩定地增加其代謝存量；虹吸是指生物體處於飢餓狀態時，所有位置的集合，必須逐漸減少其代謝存量；系統的活轉性是指所有轉置均能無限觸發(fire)；而死結的檢查，有助於判斷生物路徑受阻時，是否無法達到反應平衡等觀念。

2.2.3 信號傳導路徑

以細胞內的交互作用而言，信號傳導(signal transduction)是指來自外界的刺激，與細胞膜上的專一性受體(receptor)結合，引發該細胞產生一連串反應，把細胞外的信號帶入細胞內，以啟動相對應生理反應的一連串過程。簡單的傳導過程，只需配位體(ligand)分子與蛋白質受體於細胞膜上黏合即可；複雜的傳導過程，則可能涵蓋數個配位體與受體之間的互動，甚至需要細胞內其他作用的配合，才能完成整個信號傳導的過程。而信號在細胞體內所進行一連串的反应路徑，通稱為信號傳導路徑(signal transduction pathway)。

上述外來刺激通常指賀爾蒙或細胞激素等胞外信息分子。賀爾蒙負責傳遞長程生理指令，經由血液傳送並與目標細胞接觸後，結合到細胞膜上的受體，把信號指令傳導到細胞內，藉由蛋白質激酶或磷酸酶活化某一關鍵酵素，開始進行預設的功能(例如：分解肝糖的醣類代謝作用、新陳代謝作用)以因應身體所需。而細胞激素則負責傳遞免疫細胞之間的短程信號，可刺激局部細胞增生，亦可啟動細胞內各種生理功能(例如：細胞週期循環)。

細胞內的每一信號路徑都各有其生物功能及意義，當細胞收到信號而改變基因或蛋白質反應時，兼具有放大作用(amplification)與彈性模組(flexibility)此二大特點，其目的即在調控細胞狀態與功能，使細胞或生物體維持生存之平衡狀態，是細

胞生理極重要的手段。所謂放大作用與真空管的電流放大作用相似，是指酵素活化過程，不斷將基質催化成產物，而產物會再將信號傳導給下一步反應，信號因此而被放大。所謂彈性模組是指每一步信號傳導都代表一個層次，各層次由數種不同模組所組成，因此組合彈性且多樣化，可以因應不同細胞的獨特需求。

生物體內有許多重大功能，都需藉由信號傳導來調控其機制，例如：細胞週期的進行、新陳代謝作用等，而蛋白質之間的磷酸化(phosphorylation)作用，則扮演了重要的調控角色。在信號從細胞膜外傳送到細胞核中的目標物，改變參與物質的惰性(inactive)或活性(active)狀態的同時，信號傳導的動力學可能是非線性的基因活化信號傳送，也有可能是線性的分子狀態改變。生物學家通常以定性(qualitative)實驗來推斷細胞內的訊息傳遞行為，而數學家則藉由此實驗數據推演出相應合的微分方程式或動力學公式。雖然藉由數學模型(mathematical formalisms)可以幫助了解信號傳導在細胞內的複雜動力學行為，但如何在眾多內在或外在突發因素下，消除傳導時的不確定性，使信號傳導維持穩定且不影響生物個體的整體性，是近來學者致力研究的課題。

在生物反應調控路徑的比較中，信號傳導路徑較代謝路徑來的複雜，除了必須涵蓋複合物的形成、接觸反應(catalytic reaction)、與轉置(transportation)的反應外，尚須包含從細胞膜到目標物所參與活性狀態轉變的信號傳送反應；換言之，信號傳送時的動態元素與分子狀態改變時的靜態元素，都是模擬路徑應考慮的變數環境。

雖然如此，2004年時，Lee 等人[27]仍致力於 Petri Net 理論之研究，成功模擬出由 IL-1RI 複合物所誘發的 NF-kB 的活化反應。而 Heiner 等人[15]則運用定性 Petri Net 來模擬並驗證(validate)細胞凋亡反應路徑。其模型為：(1) 位置(place)：代表生化受體或化合物；(2) 具備對應弧(arcs)的轉置(transitions)：代表生化基質(substances)彼此之間的關係；(3) 測試弧：代表酵素反應。

2005年，Takai-Igarashi [53]曾指出，Petri Net 累積模擬更大範圍的信號傳導系統時，容易發生無法重覆使用、分享與計次限制等矛盾，故提出 CSNO(Cell Signaling

Network Ontology)的單位集合標準觀念。

2006年，Li等人[30]則提出以下數種模擬分析信號傳導路徑的論點。(1)其方法學著重於分子互動與機制；(2)歸納出涵蓋結合反應(association)、自動磷酸化(phosphorylation)與易位(translocation)...等12種反應類型；(3)介紹活化傳導元件(activation transduction components)的新觀念，以描述特殊酵素活化後，信號自我增殖的反應過程。

2.2.4 醫藥代謝路徑

藥物治療時，西醫通常採單方或複方的對症下藥原則，而中醫則考量病患氣血情況後，做全方位調理，二者都可能因為知識不足，而產生只求藥效、不明藥理的狀況。例如：化學治療用藥企圖經由誘導癌細胞的細胞凋亡形式，抑制癌細胞生長，但因對藥物引發腫瘤細胞機制的瞭解不足，所以造成存活率差異不大的效果不彰現象。而中醫則因成份複雜，療效機制不同，所以可能因為某些成分抑制了真正療效，而造成無療效的假象。故近幾年來，專家學者開始投注心力於醫藥代謝路徑(medicine metabolic pathways)的研究。

以表格1之醫藥代謝路徑應用為例，生化學家欲研究抗愛滋藥劑之進階作用時，針對病毒蛋白酶抑制原理建模時，必須描繪出代謝途徑與基因交互作用的系統架構，於研究範圍內，有系統地改變組成成份或外部生長條件，以觀測相對應之變化，將實驗數據帶入模型後，即可根據模型預測的情況，不斷進行週期性修訂與微調，以建立可調控與預測的模擬系統環境。得到理想的模型後，生化學家不需透過人體或實驗室實驗，即可預測或反映出生物系統的真實性。

表格 1 醫藥代謝路徑之應用

藥物	作用	原理	生物路徑
磺胺藥	消炎藥	競爭性酵素抑制	代謝
抗愛滋藥劑	治療愛滋用藥	病毒蛋白酶抑制	代謝,基因
青黴素(penicillin)	抗生素	蛋白酶不可逆性的抑制	代謝,基因
沙林(Sarin)	神經病毒	化學性抑制劑	代謝,信號傳導
磺胺藥	消炎藥	競爭性酵素抑制	代謝

資料來源：本研究整理

舉例說來，Pissara 等人[42]，於 1996 年時，利用描述在 *penicillium chrysogenum* 中盤尼西林(penicillin)合成的定量分析模式，來預測控制及彈性係數。2005 年 Peleg 等人[39]，則發展從細胞開始攝取藥物到產生癌細胞死亡效應的路徑模型，並投以肺癌患者做化學療法的健擇用藥於其中。2006 年時，亦有專家學者特別針對造血作用的調控機制進行模擬，並研究 IL-6 的角色定位，定義此一第六介白質是免疫系統蛋白，具有降低抵抗力、雙重穩定造血幹原細胞、自我更新以及許可區辨的效能，若利用基因調控活化 IL-6 的正向回饋循環，會出現自我分泌迴路的功能。

2.3 細胞凋亡

2.3.1 細胞死亡現象之分類

細胞死亡的現象可分為細胞壞死(necrosis)及細胞凋亡(apoptosis)二種。當細胞以壞死方式死亡時，早期會發生 DNA 片段化(fragmentation)，染色質分佈不規則，邊界不清，出現沒有細胞膜包住的細胞核碎片的情況，後期則細胞核溶解消失，細胞漲破，釋出溶解酵素而引起發炎反應，影響周圍一群細胞或一塊組織。相對地，當細胞以凋亡方式死亡時，細胞是有計畫地縮小體積，活化去氧核糖核酸內切酶，在保留細胞膜的完整性的同時，形成凋亡小體，最後被巨噬細胞所辨識，故不會影響附近周遭的細胞。二者之間的比較，參見表格 2 所列舉之細節。

表格 2 細胞凋亡與壞死之比較

	細胞凋亡	細胞壞死
刺激源	生理學的、有時是病理的、和不消耗 ATP 的情況	病理的、毒素、和消耗 ATP 的情況
牽涉細胞的數目	單一的細胞	一群的細胞；部份的組織
細胞間的附著性	較早失去	較晚失去
細胞膜的完整性	呈現	破壞
細胞膜的不對稱性	消除	呈現
細胞的體積	減少	增加 (腫瘤病)
細胞核的結構	細胞核固縮，隨後破裂	細胞核膨脹，隨後分解
染色質	壓縮	不聚集，部份分佈不規則；隨後分解
細胞器	保持未受損的最終階段；可以看到形態學的變化	較早的破壞

	細胞凋亡	細胞壞死
溶小體酶	沒有釋放	釋放
能量依賴的過程	是的	沒有
細胞的 DNA 內容	減少	不變
DNA 片段化	在核小體之間分裂 200 bp (DNA 碎片)	DNA 任意蛻變 (DNA 污跡)
最終階段的形態學 模板	凋亡小體	任意的蛻變
吞噬作用	凋亡小體	在發炎反應的終點 (淨空)
發炎的反應	沒有	呈現

資料來源：Hetts, 1998; McConkey et al., 1996

近來，細胞凋亡已成為專家學者研究癌症領域和治療應用十分熱門的方向。apoptosis 此一名詞，最早是由英國的 Kerr 等人於 1972 年所提出，提出細胞凋亡最主要的機制在於維持細胞恆定的基本觀念，用以描述在形態上有別於細胞壞死的細胞死亡過程。當時，亦有人提出計劃性的程式細胞死亡 (programmed cell death) 的觀念，指出在生物體內，單一細胞會受到內在基因的調節或外來傷害等信號刺激，而導致細胞的生化及形態改變，進而引起細胞自殺，此一現象稱為細胞凋亡。這一重要的生物程序，目的是要將多餘或是可能對生物體有傷害的細胞，以不影響鄰近細胞個體的死亡方式，維持細胞狀態的平衡。

2.3.2 細胞凋亡之生化形態特徵

細胞發生凋亡變化時，在生化學以及形態學有明顯差異現象。生化的特徵是：核小體之間的鄰接部雙股螺旋(DNA)斷裂形成 180~200bp 或其整數倍的寡核酸碎片，並於電泳實驗中呈現典型的梯狀條帶，而其一連串的過程是由活性的鈣離子或鎂離子所誘導。形態學的特徵是：凋亡細胞單個散開分佈，首先，細胞變圓，並與鄰近細胞脫離，失去微絨毛(microvilli)，胞漿皺縮(cell shrinkage)，細胞膜擴張呈空泡狀(membrane blebbing)，並與細胞膜融合，此時，核染色質密度增高呈半用形，並凝聚在核膜周邊，接下來，DNA 發生片段化(fragmentation)，染色質濃縮(chromatin condensation)，進而細胞膜內陷，最後細胞膜將各種胞器及染色質碎片裹成凋亡小體(apoptotic bodies)，由巨噬細胞(macrophages) 或鄰近細胞所識別、吞噬，或自然脫落而離開生物體，藉此避免發炎反應[43] [58] [21] [38] 。

2.3.3 細胞凋亡之功能

多數人認為程式細胞死亡的功能在於：細胞凋亡對多細胞生物的發育(development)發展及維持細胞恆定(homeostasis)具有關鍵性之影響力。在發育方面，凋亡異常，無法將多餘細胞自胚胎型態移走時，將發生胚胎手指與腳趾塑形異常、或胸腺細胞免疫異常等問題；在細胞恆定方面，凋亡表現不足，無法將會辨識自身蛋白的免疫細胞移除時，會造成自體免疫或發炎反應等病症；細胞凋亡受到不當抑制時，過量不死的細胞則為癌症前兆；另一方面，凋亡表現過度，細胞大量死亡時，就發生帕金森氏症(Parkinson's disease)、神經退化、AIDS 以及骨質疏鬆(osteoporosis)等病症。為平衡細胞生態，維持人體健康，所以生物學家與醫學家一直不間斷地了解這些生理機制並進一步利用細胞凋亡來調控治療疾病，因而實驗研發出各種抑癌藥物(例如：cisplatin)。[47] [54] [2]

2.3.4 細胞凋亡之過程

為增進研發之瞭解程度，可將細胞凋亡依時間先後的過程分為起始、統合與執行等三個階段時期。起始階段(initiation phase)：細胞於細胞膜上或細胞內不同感應器接收外來信號或刺激後，以活化細胞內特殊的死亡信號為目的地，將訊息傳遞下去；統合階段(integration phase)：細胞啟動正、反兩面與凋亡相關的活化路徑時，經統合多方訊息後，Bcl-2 家族蛋白的調節與 Caspase 活化情況，是決定細胞存活與否的重要關鍵；執行階段(irreversible execution phase)：在細胞接受死亡訊息後，細胞內的蛋白質與 DNA 將以不可逆之步驟走向自我毀滅，最後被鄰近的巨噬細胞吞噬而消失。[8]

2.3.5 誘發細胞凋亡之因子

誘發細胞凋亡的因素很多，但大致可區分為本質性誘發(intrinsic)以及外在性誘發(external)二大類。外在性誘發，是指細胞體外的其他免疫系統的細胞，釋放誘發因子，活化細胞膜上的死亡接受體(death receptor)，導致細胞凋亡現象，此類因子大多被歸為 TNF(Tumor Necrosis Factor)，例如：CD95(FAS、Apo1)、FASL、TNF α 、TNFR1(p55、CD120a)、CAR1、DR3、DR4、DR5 及 NGDFR(nerve growth factor receptor)[1]。而本質性誘發，大多經由幅射線、日照、外力壓迫等方式，用以調控細胞內部本身的信號，破壞細胞體內的促進細胞凋亡性因子(apoptotic)和抑制細胞凋亡性因子(anti-apoptotic)彼此之間的平衡，藉以誘發凋亡反應。其中，常見的促凋亡蛋白包含：Cytochrome C、Caspases、AIF(apoptosis inducing factor)...等；常見的凋亡性因子包含：Bax、Bad、Bid、Bik...等；抑制細胞凋亡性因子包含：Bcl-2、Bcl-Xl、FLIP、IAP...等。其分子互動細節，可參見圖 4 所示之 KEGG[25]人類細胞凋亡路徑網路圖。

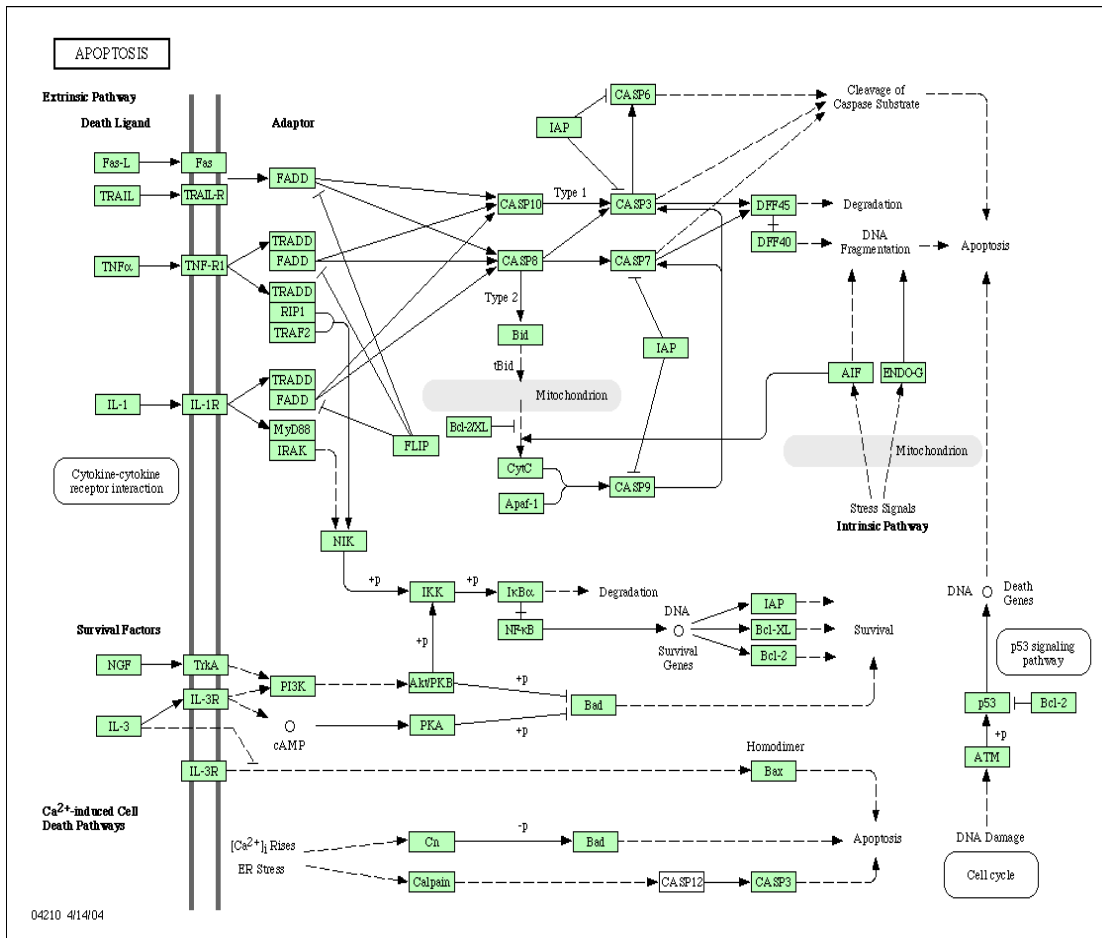


圖 4 細胞凋亡路徑圖。箭頭代表信號路徑方向，虛線箭頭表示間接反應。

資料來源：KEGG [25]

2.4 建模之模式

生物調控路徑的模擬，其困難點在於必須在定量(動力學)模擬與定性(隨機矩陣)模擬之間做區別。而傳統以方程式為基礎(equation-based)的數學模式，其優點是可觀測任何時間點的分子變化量，缺點是不適合以直覺方式描述調控過程的因果關係。而圖形式的 Petri Net 模式(model)，不僅具有正規的數學表示法，亦兼具直觀的圖形表示法，此為其最大功能之所在。

長久以來，第一個生化系統模型即是運用所知的基質濃度、平衡常數以及反應速率做為動力學參數的路徑模擬。這些以微分方程做為系統解決之道的的方法，其目的在預測該系統中各分子互動的動力學。

基因調控的數學模式，除了使用圖形化呈現的 Petri Net 外，2002 年時 Hidde de Jong [16]曾將當時專家學者所提出的模擬模式，做了一番整理，包括：非線性常微分方程、線性片段常微分方程、隨機方程、偏微分方程、定性微分方程...等微分方程(differential equations)所建立的動力學模式；以及 2000 年 Friedman 等人[9]所提，以有向的非循環圖形來表示基因調控架構的貝氏定理網路(Bayesian networks)；1969 年 Kauffman [24]使用布林變數或函數描述基因活性狀態或分子間互動情況，以計算基因被其他活性基因影響之狀態的布林網路(Boolean networks)；1983 年 Hayes-Roth 等人[13]提出，包含事件集合與規則集合的規則式法則(Rule-based formalisms)；另外，亦列出以有向圖無向圖(Directed and undirected graphs)為圖形知識呈現基礎的資料庫，例如：KEGG [23]、GeneNet [26]...等。圖示整理如下圖圖 5 所示。

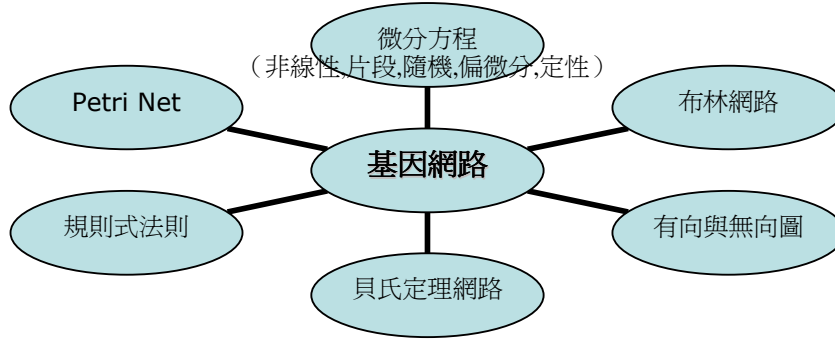


圖 5 基因網路模擬之模型

資料來源：本研究整理

代謝網路的數學模式，除了使用圖形化呈現的 Petri Net 外，最常被提出使用的是通用、單基質單產物、多基質產物等 37 個方程式所建立的動力學類模式[56]。其他尚有 1998 年 Stephanopoulos 等人[52]提出，可以藉由代謝平衡來決定通量(flux)的觀念；Hatzimanikatis 等人[12]提出，混合整數線性規劃模式來求得代謝網路的最佳通量分布；1995 年 Delgado 等人[6]提出，使用代謝控制分析(MCA)來決定網路中的彈性係數；而 Jamshidi 等人[22]則於 2001 年發展出 Mathematica 套裝軟體，並動態模擬出紅血球細胞的代謝網路。圖示整理如下圖圖 6 所示。

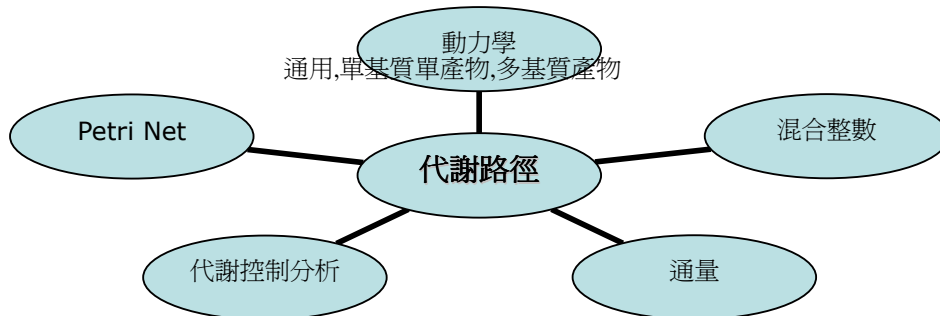


圖 6 代謝路徑模擬之模式

資料來源：本研究整理

至於信號傳導的數學模式，因為此乃三大路徑中最晚進入的研究領域，故專家學者們提出的模型及工具有限，排除最常使用的 Petri Net 及動力學模型外，另一被專家學者所重視的，是規則式法則模型。而資料庫的基礎知識呈現方面，仍以有向圖無向圖為大宗(例如：KEGG [23])。圖示整理如下圖圖 7 所示。

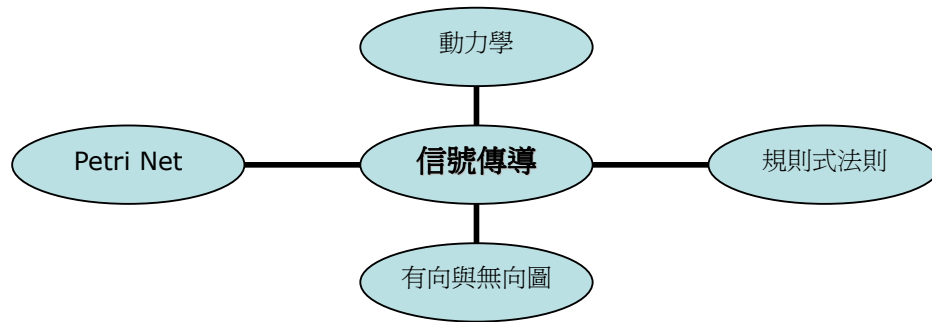


圖 7 信號傳導模擬之模型

資料來源：本研究整理

2.5 Petri Net

1962 年 Petri [41] 提出 Petri Net 的觀念，原本是用以探討電腦系統內部元件的通訊理論，經由 A. W. Holt、F. Commoner、M. Hack 與其他 MIT 研發人員多年研究後，至 1976 年止，終成兼具圖形化與數學式的正規模擬工具，不僅能夠表示系統的同步與互斥行為，亦可對系統做定性與定量分析。此一具備推論能力的系統建模分析與發展工具(如以下圖 8 所示)，廣泛應用於需要軟硬體同步發展的嵌入系統、網路協定或製造系統的模組、排程、控制、效能評估方面等領域，所模擬的資訊系統，具同時性(concurrent)、平行性(parallel)、分散性(distributed)、非決定性(non-deterministic)、非同步性(asynchronous)或隨機性(stochastic)等性質[40]。

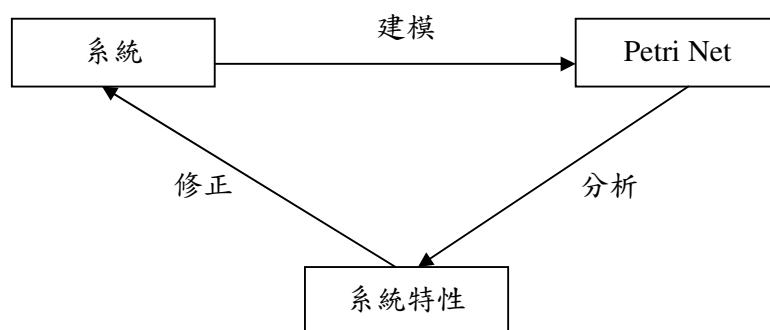


圖 8 Petri Net 用於建模、分析與修正系統

資料來源：Peterson J.L., 1981

2.5.1 Petri Net 之基本定義

一個低階(low-level)Petri Net 的網路，由位置(place)與轉置(transition)此兩種基本元素所組成，兩者之間由射線(arc)所連接。其具備五項要素， $PN = (P, T, F, W, M_0)$ ，詳細說明如下所示[63]：

- (一) $P = \{ p_1, p_2, \dots, p_m \}$ ，是有限個數位置的集合，以圓圈表示。通常用以表達被動(passive)或靜態的事件。其後，因系統愈形複雜，高階 Petri Net 乃發展出連續式(continuous)和離散式(discrete)兩種形式。

- (二) $T = \{ t_1, t_2, \dots, t_n \}$ ，是有限個數轉置的集合，以條狀或方框表示。通常用以表達主動(active)或動態的事件條件。其後，因模擬的系統愈形複雜，故除延伸出連續型和離散式兩種形式外，亦加入延遲時間(delay time)的觀念於其中。
- (三) F 是射線的集合。射線以箭頭表示，具方向性，且上附權重(weight)觀念。由位置指向轉置的射線稱為輸入射線(input arc)；相反地；由轉置指向位置的射線稱為輸出射線(output arc)。其後，模擬機制更形複雜後，高階 Petri Net 依需求而發展出正常射線(normal arc)、抑制射線(inhibitor arc)和測試射線(test arc)等三種形式。
- (四) $W : F \rightarrow \{ 1, 2, 3, \dots \}$ ，是權重方程式。權重 k 的射線，可解讀為一組 k 條並行的射線，權重為 1 時，可省略不記。低階 Petri Net 的權重必為正整數，當轉置被觸發(fire)後，應從輸入位置(input place)取走多少代幣數，與此有關。。
- (五) $M_0 = \{ M(p_1), M(p_2), \dots, M(p_m) \} : P \rightarrow \{ 1, 2, 3, \dots \}$ ，是初始標記(initial marking)，其中 $M(p_i)$ 表示在位置 p_i 內代幣(token)的數目，以圓點表示。非負整數的代幣可視為系統狀態，而所有代幣數的集合，即稱為該網路之標記。其後，高階 Petri Net 因需求而發展出另一派相異顏色代幣的圖示表示法。

2.5.2 Petri Net 之圖形表示法

以下是鹽酸的化學反應式： $H_2 + Cl_2 \rightarrow 2HCl$ ，若以 Petri Net 的圖形表示法來模擬時，以圖 9 表示化學式反應前的狀態，而圖 10 則表示化學式反應後的狀態：

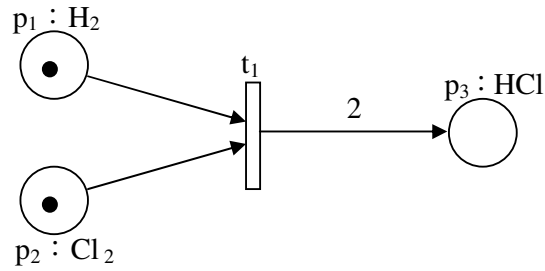


圖 9 化學式反應前狀態

資料來源：本研究

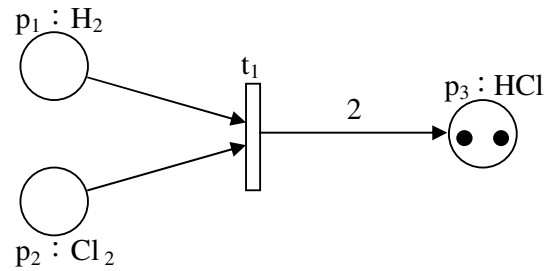


圖 10 化學式反應後狀態

資料來源：本研究

圖 9 代表氫、氯分子結合成氯化氫前的初始狀態，其中，位置 p_1 代表 H_2 分子，而該位置所含的一個代幣則表示存在一單位的 H_2 分子；位置 p_2 代表 Cl_2 分子，而該位置所含的一個代幣則表示存在一單位的 Cl_2 分子；位置 p_3 代表 HCl 分子；轉置 t_1 代表氫、氯分子結合成氯化氫的整個事件。就轉置 t_1 而言，位置 p_1 、 p_2 是其輸入位置 (input place)；而位置 p_3 則為其輸出位置 (output place)。圖 10 表示氫、氯分子結合成氯化氫後的狀態，可見氫、氯分子位置內的代幣均已清空，而反應生成二單位的氯化氫。

2.5.3 Petri Net 之數學表示法

Petri Net 的圖形結構亦可用數學模式來表示，其關聯矩陣 (incidence matrix) 表示圖形結構，而標記 (marking) 表示結構的狀態及代幣數目。一個具有 n 個轉置與 m

個位置的 Petri Net，其關聯矩陣 $A = [a_{ij}]$ ，是一個 a_{ij} 為整數的 $n \times m$ 矩陣，定義為：

$$a_{ij} = a_{ij}^+ - a_{ij}^-$$

其中， $a_{ij}^+ = w(t_i, p_j)$ 表示從轉置 t_i 到位置 p_j 射線上的權重值， $a_{ij}^- = w(p_j, t_i)$ 表示從位置 p_j 到轉置 t_i 射線上的權重值。以圖 9、圖 10 為例，其關聯矩陣 A 應為下式：

$$A = \begin{bmatrix} & p1 & p2 & p3 \\ -1 & -1 & 2 \end{bmatrix} t$$

Petri Net 的圖形結構，可以經由此關聯矩陣完全表達之，而其狀態則需透過標記表示。例如：圖 9 的初始狀態，其標記為 $M_0 = [1 \quad 1 \quad 0]$ 。[63]

2.5.4 Petri Net 之分類

隨著系統不斷增加其複雜度，基本的 Petri Net 陸陸續續延伸出各具特性的理論，依其反應權重的整數性，可分為低階(Low-level)與高階(High-level)二種類型，試列述於下：

(一) 低階(low-level)Petri Net：是指最原始的普通(ordinary)Petri Net， $PN = (P, T, F, W, M_0)$ ，其射線上的權重數值必為正整數 1。1993 年第一個以 Petri Net 模擬代謝路徑的模型應用出現，其後，1996 年 Raddy 等人[46]曾以 P 表示反應基質的狀態，以 T 表示化學反應步驟。以只有條件與事件的定性方式，模擬離散性(discrete)的代謝網路。2004 年 Heiner 等人[15]亦運用定性 Petri Net 來模擬並驗證(validate)細胞凋亡反應路徑。

(二) 高階(high-level)Petri Net：又因功能性之不同而可分為以下數類：

(1) 時間(Time)Petri Net：其最大特點是可指定位置與轉置的延遲時間(delay time)。1999 年 Koch 等人曾以此時間效應研究五碳糖磷酸反應，2007 年 Li 等人[29]亦曾運用延遲時間觀念於細胞凋亡的模擬。

- (2) 隨機(Stochastic)Petri Net：其最大特點是位置和轉置，可依機率分布指定延遲時間，1998 年 Goss 等人[10]曾以此模式模擬蛋白質的合成過程，其假設 RNA 聚合酶具固定濃度，而一旦基因活化，酵素即被持續生成。
- (3) 階層式(Hierarchical)Petri Net：允許先前定義過的網路以單一位置或轉置方式，出現在新的生物路徑網路。
- (4) 彩色(Colored)Petri Net：以不同顏色和註記表示代幣之間的差異，所以，轉置的觸發規則(firing rule)將更形複雜，如此之特色，使其具備避免無生化意義卻有結構特性的模型優勢。
- (5) 混合(Hybrid)Petri Net：其位置與轉置具備離散或連續性質。代幣表示反應基質濃度且具備連續數值之意義。另外，射線上的權重則可使用混合功能來表示，是一可以代入函數的模擬模型。1998 年 Hofestädt 等人[18]曾藉由混合 Petri Net，將定量的動力學參數整合到連續性(continue)的位置(place)中，而連續位置中的代幣(token)數值表示反應物質的濃度，轉置(transition)上的射線(arc)權重(weight)則表示反應的速率。2000 年時，Matsuno 等人[32]亦曾以此模式建構蛋白質合成、 λ 噬菌體基因開關機構、分析醣解反應中乳糖操縱組(lac operon)的基因調節機制...等等研究。
- (6) 混合功能(Hybrid Functional)Petri Net(簡寫為 HFPN)：除階層式 Petri Net 外，以上其他 Petri Net 均可視為其子集之一。自 2004 年 Nagasaki 等人[36]提出此架構以來，Matsuno 等人[35]即致力於以 HFPN 模式建立生物路徑之模擬，並全力支持開發模擬系統工具(例如：從 GON 演進到 Cell Illustrator[4]的模擬工具)。
- (7) 模糊(Fuzzy)Petri Net：其最大特色是涵蓋邏輯的命題概念於定義之中，以真值評定的模糊命題(truth-qualified fuzzy proposition)表達不確定、不精確的資訊。C. G. Looney 首先於 1988 年提出模糊模擬的法則式推論。其後，陸續有專家學者提出高階模糊理論或模糊 Petri Net 之專家系統(Fuzzy Petri Net Based Expert

System)等架構。[63]

- (8) 物件導向(Object-Oriented)Petri Net：以物件為主的階層式組織架構系統。大物件內可包括小物件的觀念，具有隱藏資料，簡化架構規劃，增加擴充性的特性。1990 年 Sibertin-Blane [51]正式提出此觀念後，1993 年 Lee 及 Park [28]亦提出物件導向高階 Petri Net 的觀點，以增加模組化、易維護及重複使用等特性。

2.5.5 Petri Net 之迷思

Petri Net 原被設計於工業工程排程的使用，雖然，近年來被視為生物路徑模擬的一種模型，也隨之新增改良其功能，但仍有改善的空間，其內容列述如下：

- (一) 多重路徑的選擇：實際生物網路中，單一基質可能同時參與數個反應。假若二個及其以上的轉置，共用一個有限代幣數的位置，且其多重路徑均需耗損無限量的代幣數時，生化路徑的選擇，將會決定是否產生單一路徑耗盡代幣的現象。
- (二) 可逆反應實作：一個可逆的化學反應是生化反應的普遍現象，Petri Net 基於模型定義限制，只能以一個向左、一個向右的雙反應式來表達可逆的單反應式。
- (三) 穩定平衡狀態(steady state)：Petri Net 假設代幣到達後，轉置才得以觸發，且轉置前後的代幣數相等，換言之，所有代幣將參與反應式之進行，故模擬系統結束時的狀態，必須呈現實際生物網路的穩定狀態。
- (四) 抑制劑(inhibition)概念：抑制劑分為競爭型(competitive)、不競爭型(uncompetitive)、與非競爭(uncompetitive)型三類，後期高階的 Petri Net 於其模型中加入抑制劑射線來表示此觀念，但低階 Petri Net 仍缺乏此概念，故選用模擬模型時，須依使用者需求，小心選擇適當種類的 Petri Net。
- (五) 建置速度慢：以 GON[4]模擬工具的 demo 為例，單只於 GUI 畫面拖曳建置生物網路，就得花費 2 小時時間，倘若系統參數複雜、公式繁瑣，建模速度可能倍增。
- (六) 不易擴大模擬範圍：除納入物件導向觀念的 Petri Net 模型或工具外，擴大或合

併二個已建模的系統，對 Petri Net 而言，都不是容易的事。而以物件導向開發的工具，因其連續型或離散型的模型定義特性，亦將限制模擬系統的擴增性。

(七) 增加任何轉置反應後，不保證延遲時間之正確性。

2.6 生物反應類型

2006 年，Li 等人[30]曾提出 12 種信號傳導路徑的反應類型，並於 2007 年將其運用於時間 Petri Net 的細胞凋亡信號傳導模擬上[29]，而本論文依據後者論述，定義細胞凋亡信號傳導之相對映的分子互動情況，將使用的反應類型，列點描述於下：

2.6.1 初始化反應

只提供參與反應的基質活性被觸發一次的反應，即為初始化反應(Initial)。以 Petri Net 模擬時，該初始化轉置沒有輸入位置，只有輸出位置，具備只觸發一次的特性，觸發過後即失去作用性。初始化反應的生化圖示及相對應之 Petri Net 表達，請參見下列圖 11 所示。

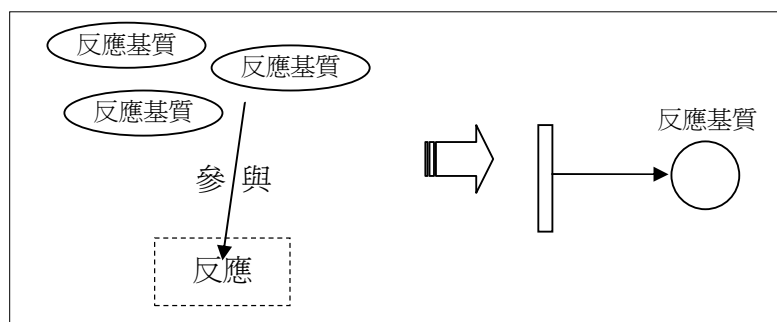


圖 11 初始化反應

資料來源：Chen Li, 2007

2.6.2 結合反應

將同質(homo)或異質(hetero)雙體聚集黏合後，產生複合物(compound)的交互作用的過程，即為結合反應(Association)。不過，此處的結合反應，指的是配位體(ligand)與受體(receptor)之間的交互作用。而為了對映 Petri Net 的模型定義，凡生化反應中的化合物或受體均被表示為位置(place)，生化反應基質(substance)間的關係則被表示為轉置(transition)反應，而此結合轉置的觸發(fire)條件則為：必須配

位體存在，反應才可觸發。結合反應的生化圖示及相對應之 Petri Net 表達，請參見下列圖 12 所示。

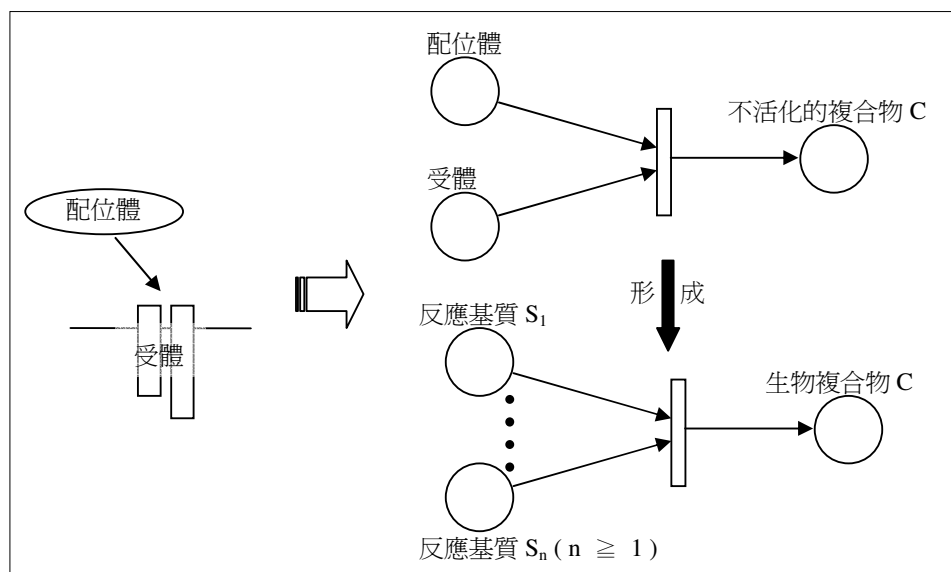


圖 12 結合反應

資料來源：Chen Li, 2007

2.6.3 同二聚反應

將二個相同的反應物基質，經由聚合反應而形成同質二相的過程，即為同二聚反應 (Homodimerization)。其本質與結合反應相同，但以 Petri Net 模擬時，只須將反應物基質視為單一輸入位置 (input place)，且其轉置的輸入射線 (input arc) 具有 2 單位之權重 (weight) 即可。同理，其概念可套用於三聚合物或四聚合物等複合物的形成反應。同二聚作用的生化圖示及相對應之 Petri Net 表達，請參見下列圖 13 所示。

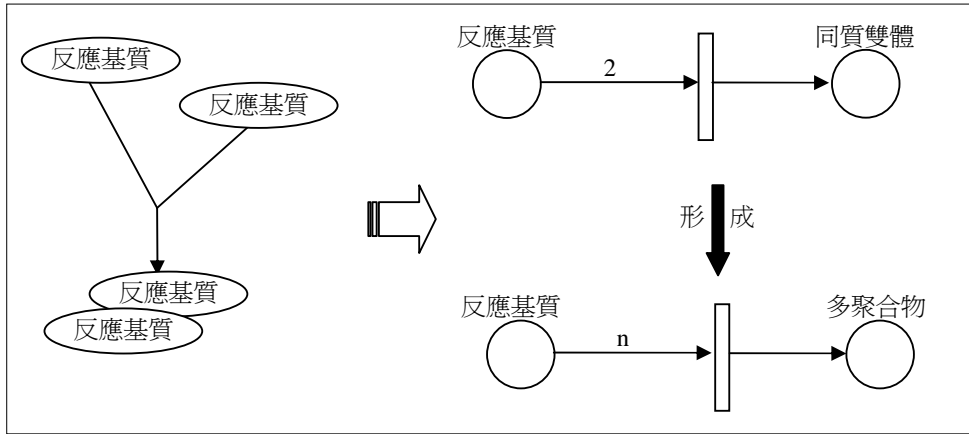


圖 13 同二聚作用

資料來源：Chen Li, 2007

2.6.4 易位反應

當分子(molecule)、基質、或離子(ion)必須在細胞膜或血流中移動所在位置時，即可使用此易位反應(Translocation)來表示。以 Petri Net 模擬時，該轉置的輸入位置與輸出位置均為相同的反應物基質，改變的是該基質所在的容器位置。下列圖 14 所示，即呈現易位反應的生化圖示及相對應之 Petri Net 表達。

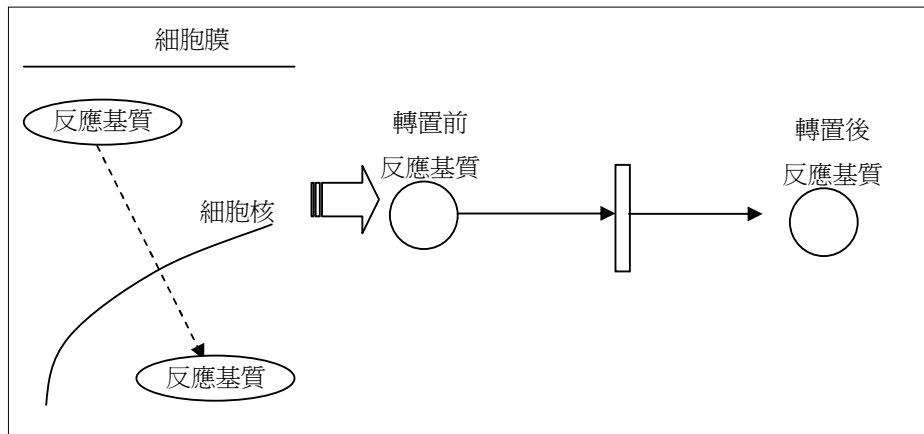


圖 14 易位反應

資料來源：Chen Li, 2007

2.6.5 分解反應

當複合物必須分離或分解成更小的分子或離子時，即以此分解反應 (Dissociation) 表示之。此反應與結合反應相反，以 Petri Net 模擬時，是將單一輸入位置，經由分解轉置作用後，生成二個或二個以上的輸出位置。分解反應的生化圖示及相對應之 Petri Net 表達，請參見下列圖 15 所示。

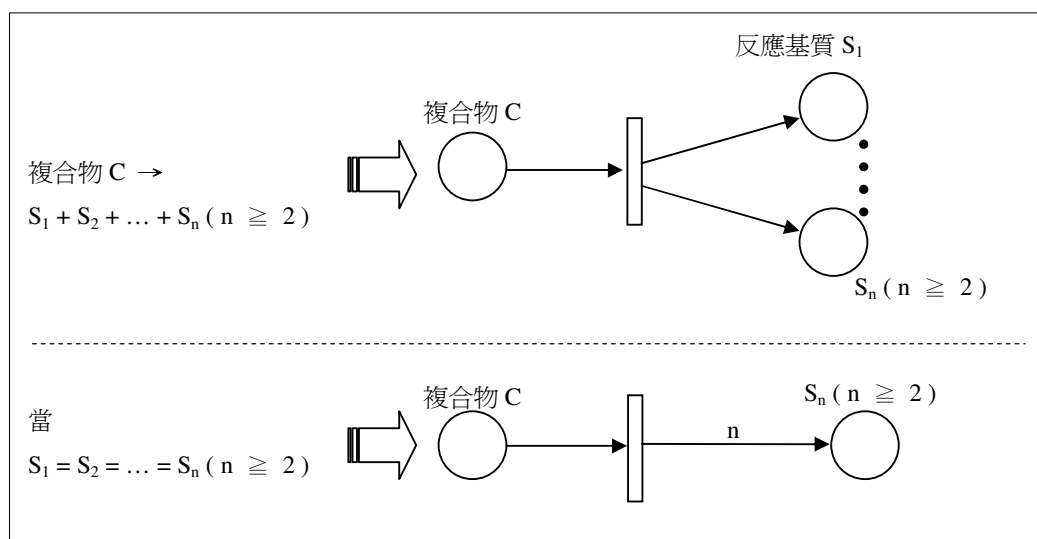


圖 15 分解反應

資料來源：Chen Li, 2007

2.6.6 化學反應

將反應物基質轉換成產物的過程，即為化學反應 (Chemical)，此乃信號傳導路徑中最常見的反應。然而研讀文獻[29]時，發覺時間 Petri Net 乃屬單向反應，會將所有的代幣 (token) 全部反應消耗殆盡，與實際生化反應現象不符，故凡此反應皆改採化學平衡解的計算物件來模擬，雖然此計算物件需要輸入反應式之基質濃度與平衡常數，但是，部份參與然後到達平衡狀態的單向反應，較貼近現實的模擬環境。化學反應的生化圖示及相對應之 Petri Net 表達，請參見下列圖 16 所示。

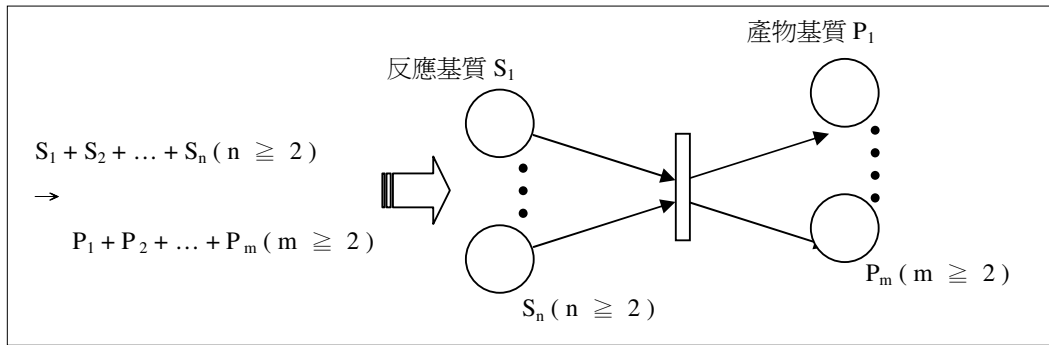


圖 16 化學反應

資料來源：Chen Li, 2007

另外，當某一基質位置同時參與二個以上的反應轉置時，若不將延遲時間控制到恰到好處，將發生多重路徑的資源搶奪問題，使某些反應路徑因為缺乏代幣而無法繼續其信號傳導路徑的反應，為解決此問題，特將 t_4 的結合反應以化學平衡解的計算物件取代，唯仍保留結合反應之配位體必須存在的觸發條件。

2.6.7 酵素化反應

酵素在生物路徑具有催化劑的功能，而且，在反應式具備不耗損的性質，所以將其獨立成酵素反應(Enzymic)來表示這些特性。而以酵素動力學的計算物件模擬時，該酵素以一個位置表示之，而其酵素位置不參與反應的進行，只供成為觸發反應式的條件設定。故酵素化反應的生化圖示及相對應之 Petri Net 圖示，如下列圖 17 所表達般。

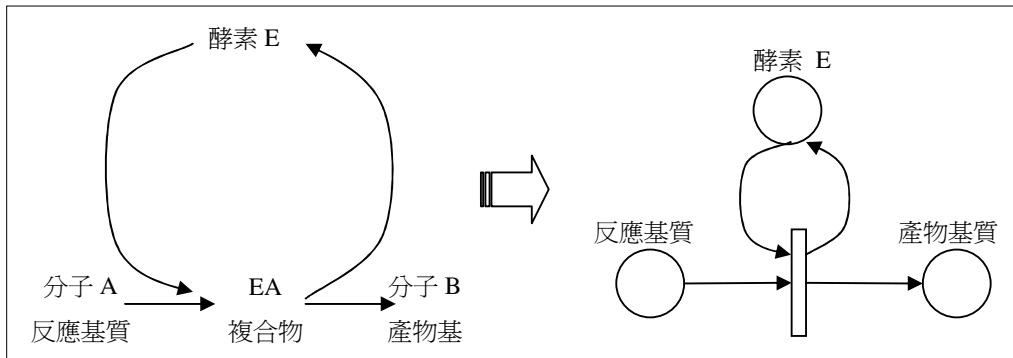


圖 17 酵素化反應

資料來源：Chen Li, 2007

第三章 系統模型

3.1 混合式生物反應路徑之模擬

生物反應路徑大致可分為基因調控網路、代謝路徑與信號傳導路徑等三大類。而本論文將包含二種及其以上的生物反應路徑，稱之為混合式生物反應路徑。然而，模擬混合式生物反應路徑有其困難點存在，例如：

- (一) 生物反應路徑繁多，每一路徑又各有學者提出不同的模擬模型，故造成混合式生物反應路徑的選取與整合困難。除非能找出完整表達生物反應路徑的最少模型組合，否則整合已存在的路徑或模型將是一件耗時之事。
- (二) 一旦模擬的範圍為混合式生物反應路徑，則其系統規模相形之下可能較為廣大，故其模擬之複雜度亦相對提昇，若能使用自動融合已建立生物反應路徑的系統，將可降低模擬之困難度。
- (三) 模擬包含二種及其以上的生物反應路徑時，若能找出具分時模擬能力的模型，以平行進行各生物反應，則將使系統模型更貼近真實的生物事實。

3.2 系統之計算物件

欲解決上述模擬困境，故本論文運用 java 物件導向系統[65]為工具進行模擬，因為此模擬工具以 Petri Net 為基石進行改良，具有動態建立 arc 之優點，且本應用領域所需的 Transition 語意，可藉由繼承表達之，故可實作不同的計算物件。

研究發現，只需使用四種 Transition 即可精確表達細胞凋亡的路徑，包含：Petri Net、初始化轉置、化學平衡解、與酵素動力學等，其繼承圖如下圖圖 18 所示。

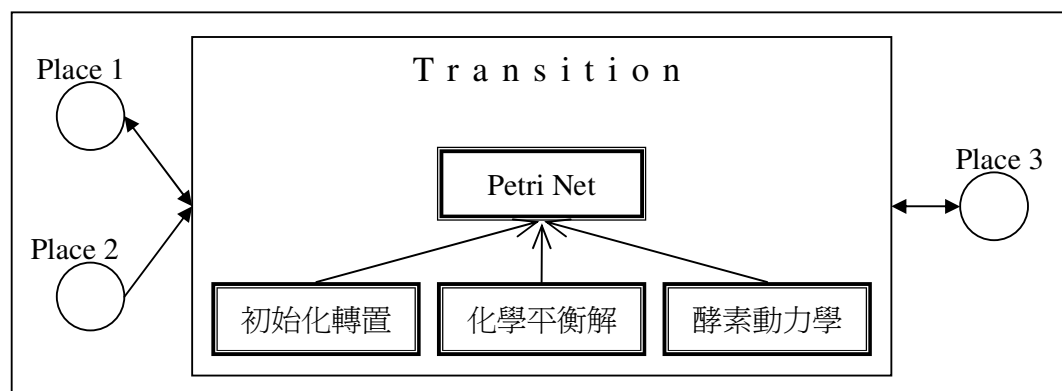


圖 18 Transition 繼承圖

資料來源：本研究整理

以物件導向模擬細胞凋亡的 Fas 信號傳導路徑時，因其具有封裝、繼承、與訊息溝通等特性，與可進行平行系統、分析與驗證的 Petri Net 結合，恰好互補其不足之處，當模擬系統的集合範圍愈來愈龐大時，專家學者依其模擬需求與目的地，在適當的生化區域選擇適用的計算物件，集結多種演算法於同一模型，即可發揮此混合式物件導向模擬環境的優點。

3.2.1 初始化轉置

繼承 Petri Net 計算物件而來的初始化轉置計算物件，乃第一次觸發的單次反應，該計算物件將系統預設的代幣資源傳入產物後即失去作用性，不再被觸發。

3.2.2 Petri Net

凡於 2.6 章節所論及之結合反應、同二聚反應、易位反應、與分解反應等生物反應類型，因其具備反應物全部生成產物及反應式計算量少的特性，故皆可使用 Petri Net 計算物件來模擬，現特將 Petri Net 模型所定義的生化反應，條列於下：

- (一) 位置(place)：舉凡生物反應路徑中的化學混合物、反應基質、參與器官、溫度、酸鹼度、狀態與情況等靜態元素，皆可被視為位置。而內含其中的代幣則表示其數量、濃度或狀態位置，可為連續型或離散型。任一位置的代幣皆須由轉置觸發而來，而轉置觸發後，經過計算修改，再透過輸出射線傳遞修正後的代幣給輸出位置。
- (二) 轉置(transition)：舉凡生物反應路徑中的化學反應、事件、作用、轉化或酵素反應等動態的活性元素，都可被視為轉置。為配合定量計算，轉置也可分為離散與連續二型，當其被觸發時，轉置將主動確認射線的型態與數目、以及各輸入位置內含代幣型態的合法性，所有必須使用的資源及觸發條件都合法後，從輸入位置取走代幣而生成新的代幣給輸出位置。轉置的計算包含延遲時間的指定，可以是單純改變反應基質的所在容器位置，亦可以是一組反應速率的計算函式。
- (三) 射線(arc)：連接靜態的位置與動態活性的轉置，其作用為表達二者之間的關係。射線不含時間延遲的觀念，但包括離散與連續兩種類型，其權重表示反應基質的數量，模擬化學反應類型時，權重代表化學反應方程式的莫耳係數。

3.2.3 化學平衡解

繼承 Petri Net 計算物件而來的化學平衡解[64]計算物件，使用二分逼近演算法，利用化學平衡常數(Equilibrium Constant, K_{eq})不斷逼進反應最終的平衡狀態。當正反應速率與逆反應速率相等時，此化學反應即成為穩定狀態(steady state)。當

計算而來的 K_{eq} 值，不落在 $[K_{eq} - a, K_{eq} + a]$ (a 是任意常數) 的平衡範圍內時，必須判斷計算而來的值是否大於 K_{eq} ，若是大於 K_{eq} ，則反應式向左進行，形成逆反應；若是小於 K_{eq} ，則反應式向右進行，形成正反應。

而計算物件啟動時，須讀入初始預設的反應平衡變化量 (δ)。當 δ 為正，表示反應的基質濃度大於產物濃度；當 δ 為負，則表示反應的基質濃度小於產物濃度。每一次逼近平衡時，所計算出的基質與產物濃度值，將顯示於系統時間對基質濃度的二維圖表結果中。

凡欲模擬的生化意義具反應物部份生成產物、反應式為可逆反應或該反應基質面臨多重路徑選擇特性，甚至生化學家必須考量較低的 cpu 及 $memory$ 使用資源時，皆可使用此化學平衡解的計算物件來模擬。

此細胞凋亡的模擬，其路徑具正向回饋特色，為了降低混合計算物件模擬的變數變化，兼顧 Petri Net 計算物件反應向右進行的特性，故調整 δ 變數，使化學反應式亦可向右反應 99 %。

3.2.4 酵素動力學

繼承 Petri Net 計算物件而來的酵素動力學[64]計算物件，使用時間切片 ($time\ slice$) 演算法，利用反應速率與延遲時間相乘的方法，將此濃度轉換值與反應物濃度相比，二者取最小值後，判斷是否持續進行反應。因為酵素動力學乃雙向的振盪反應，欲求其精確性，則須將其反應時間切成較小的切片，若時間切得不夠細微時，濃度轉換值大於反應物濃度，反應物完全反應殆盡，就無法逼近平衡常數，而影響計算物件的精準度，但是，反應時間切得愈短就會愈消耗電腦資源，所以使用此計算物件模擬時，必須視生物反應路徑環境與模擬需求考量，在二者之間取得平衡。

換言之，凡欲模擬的反應式屬可逆反應、具抑制效果，或生物反應具平行觸發且產物各自獨立特性時，皆可使用此酵素動力學計算物件來模擬，唯使用者在追求

更精確的臨界值數據時，需小心謹慎考量反應時間的設定。

本計算物件啟動時，須帶入預設的 K_{eq} 參數值，為兼顧細胞凋亡的正向路徑特色，並控制混合計算物件模擬的變數差距，故調整 K_{eq} 變數，使之 99 % 的反應式與 Petri Net 計算物件一樣向右進行；而為降低與化學平衡解計算物件之間的變數差距，須將控制時間切片的 k_{cat} 變數切至可以逼近平衡常數。

3.2.4 計算物件之比較

初始化轉置是模擬計算的第一步，將系統資源藉此傳入產物基質後，系統即可自動將每一轉置所需的反應物基質與射線權重，動態聯結並置於佇列中，以進行計算模擬排程。

以 Petri Net 模擬細胞凋亡之信號傳導路徑時，因為 Petri Net 屬單向反應的緣故，會將全部代幣轉換至輸出位置，故模擬計算的次數少、花費的時間與系統資源相對較少，是其優點。另外，Petri Net 雖然具有輸入參數較少的優勢，然，也因此而無法模擬可逆、多重路徑選擇、重覆觸發、或抑制效果等生化反應，是其缺點。

化學平衡解的二分逼近法，以逼近穩定狀態為模擬終點，於穩定與不穩定之間來回振盪的模擬曲線，近乎酵素動力學，然所花費的時間與系統資源較酵素動力學少，故若欲求得平衡後的臨界值、可逆反應、甚或多重路徑選擇，都可以考慮使用該計算物件。此計算物件的模擬效果近乎酵素動力學計算物件，當不需模擬抑制反應時，較少的參數使用，將為建模的數據搜尋帶來一大福音。

酵素動力學的時間切片，時間切割愈細微，模擬結果愈精確，但相對地，也將付出耗用 CPU 與記憶體資源等代價，故模擬範圍不大或電腦硬體設備可支援時，可隨時設定模擬之停止時間點，而不必考慮反應式是否已達平衡。另外，使用此計算物件必須帶入較多環境參數，是其功能強大優勢的原因，卻也是建模不易的主因。

表格 3 列出四種計算物件的分析、比較，以提供模擬生物反應路徑使用者，一個計算物件的選擇參考。

表格 3 四種計算物件之比較

性質 \ 計算物件	轉置 初始化	Petri Net	化學 平衡解	酵素 動力學
數學化模擬	●	●	●	●
穩定狀態模擬	○	○	●	●
可逆反應模擬	○	○	●	●
多重路徑模擬	○	○	●	●
重覆觸發反應模擬	○	○	●	●
抑制劑模擬	○	○	○	●
不耗用系統資源	●	●	◎	○
模擬計算速度快	●	●	◎	○
使用參數少	●	●	◎	○

●：是 ○：否 ◎：二者之間

資料來源：本研究整理

3.3 細胞凋亡

細胞凋亡(apoptosis, programmed cell death)，又稱程式細胞死亡，在外在性誘發的 TNF(Tumor Necrosis Factor)的家族中，Fas 因子(Fas ligands) 是屬於第二型的細胞膜蛋白質，其影響細胞核的凋亡信號路徑，可參見圖 19。

Fas ligands 通常以三聚合物的型態存在著，與 Fas 受器(receptor)結合後，將促使受器三聚合物的形成。此時，FADD 經由與相對應的 DD 交互作用後，將與受器黏合。接下來，包含 DED 的 FADD，會與 Proaspase-8 聚集成為一個受體複合物，並以 DISC 的形式存在著[57] [49]。Proaspase-8 經由 DED 與 FADD 結合後，將自動催化其活性，而後生成 Caspase-8。活化狀態的 Caspase-8 又將以二條不同的路徑，初始化下游其他蛋白質的活性(如：Caspase-9；Caspase-3)。

Caspase-8 活化下游 Caspase 的第一條路徑是：利用外在的刺激壓迫活化 p53，藉此分化 Bid 與 Bcl-2 之間的互動，間接將 Bid 的羧酸末端(tBid)轉移到粒腺體(Mitochondria)，而後，粒腺體膜電位的去極化，將使得 Cytochrome C 分子滲出至細胞溶質(cytosol)中。釋放後的 Cytochrome C 分子與 Apaf-1、dATP/ATP 及 Proaspase-9 互相黏合後，可以啟發 Caspase-9 的活性，而其啟發的過程，細述如下：
[29] [19] [3] [62]

- (一) dATP/ATP 與 Apaf-1 黏合後，將分別水解成 dADP 或 ADP。
- (二) 水解後，Cytochrome C 與 Apaf-1 將黏合並促成其複合物形成多三聚合物，而這種至少由八個原體所構成的複合物又稱 apoptosome。
- (三) 一旦形成 apoptosome，Proaspase-9 就會被其吸引住，並自動催化為活性物體。

活化狀態的 Proaspase-9 從 apoptosome 中被釋放後，將分化下游的 Caspase(例如：Caspase-3)，而且，新形成的 Proaspase-9 會不斷地被更新後的自己和 apoptosome，自動催化其活性[31]。以上活化粒腺體的訊息路徑，屬本質性誘發的凋亡調控，具加強及穩定信號傳遞的作用。

Caspase-8 活化下游 Caspase 的第二條路徑是一條具正向回饋路徑的活化反應：直接分化成 Caspase-3。被活化的 Caspase-3 將分化由 DFF45 和 DFF40 所組成的 DFF，被分化的 DFF45 由 DFF40 中游離出來，伴隨著具有去氧核糖核酸酶(DNase)活性的 DFF40 的同質性寡聚物。最後，DFF 寡聚物將誘發 DNA 發生片段化 (fragmentation) 和染色體濃縮 (chromatin condensation) [48] [59] [38]。

以上，Caspase-3 有一正向回饋的信號路徑，而 Caspase-9 於促進 Caspase-3 的活化反應過程中，亦是另一組正向的回饋路徑，此二組正向路徑，即為 Li 等人於 2007 年所提出的細胞凋亡模擬藍圖[29]，亦為此篇論文欲探討驗證模擬的信號傳導路徑範圍。

第四章 模擬與實作

本論文以物件導向的 java 系統[65]為模擬工具，運用 Petri Net、酵素動力學[64]、化學平衡解[64]等多種計算物件來模擬信號傳導路徑。當模擬系統的反應集合愈來愈龐大時，即發揮本系統動態建立射線的混合式生物反應路徑模擬優勢。而為了單純化模擬環境，除截取出的 Fas 信號模擬路徑外，其餘複雜的、不相關的分子互動，本文均忽略不論。因此，模擬之基本環境假設，標示如下：

- (一) 模擬由 Fas 所誘發的外在性細胞凋亡信號路徑。
- (二) 氣溫假設為一般實驗的標準溫度 25 度。
- (三) 參數與變數設定方面，除文獻[29]所提供之數據以及必須調整的變數外，其餘皆預設為預設值 1。

4.1 資料庫表格之建立

建立 Fas 誘發的細胞凋亡信號傳導路徑模型，需要使用一些參數資料，將其分類後，建立以下三個資料庫表格，而各表格內容的 schema 呈現如下：

```
drop table STaction /* 信號傳導反應資料, 如: 觸發規則 */
drop table STcomputationConstant /* 信號傳導計算物件所需常數 */
drop table STdefaultAmount /* 信號傳導環境起始物質的濃度 */

create table STaction ( /* 信號傳導反應資料 */
    actionid varchar(100) not null, /* id */
    fireRule varchar(255) not null, /* 觸發規則的資料表達 */
    description varchar(200) null, /* 說明文字 */
```

```
deltaG0 float not null default 1, /* 反應式平衡常數的計算變數 */
kcat float not null default 1, /* 反應式延遲時間的變數 */
reversible int not null, /* 反應式的可逆性 */
keq float not null default 1, /* 可替代 deltaG0 的平衡常數 */
primary key(actionid)
)
Go
```

```
create table STcomputationConstant ( /* 信號傳導計算物件所需常數 */
    mechanism varchar(20) not null, /* 計算物件名稱 */
    actionid varchar(100) not null, /* 反應名稱 */
    material varchar(100) not null, /* 參與反應的物質 */
    subContainer varchar(100) not null default "", /* 反應物所在容器 */
    subCoefficient int not null default 1, /* 反應物係數 */
    substrateVal float not null default 0, /* 反應物反應常數 */
    proContainer varchar(100) not null default "", /* 產物所在容器 */
    proCoefficient int not null default 1, /* 產物係數 */
    productVal float not null default 0, /* 產物反應常數 */
    substrateKm float not null default 1, /* 反應物 KM 值 */
    productKm float not null default 1, /* 產物 KM 值 */
    primary key(subContainer, mechanism, actionid, material),
    foreign key(actionid) references action
)
Go
```

```
create table STdefaultAmount ( /* 信號傳導環境起始物質的濃度 */  
    container varchar(100) not null, /* 所在容器 */  
    material varchar(100) not null, /* 物質名稱 */  
    amount float not null default 0, /* 預設的濃度或數量 */  
    primary key(container, material)  
)
```

4.2 Fas 誘發細胞凋亡之信號傳導路徑模擬

將外來誘發因子 Fas 所誘發的信號傳導路徑，運用前文所定義的分子互動類型來建置模擬之計算物件。生物路徑中各反應轉置所對映之輸入/輸出的基質位置、反應類型、計算物件、以及其生物意義，分別詳述於表格 4 之中。

表格 4 各轉置之生物意義詮釋

轉置	輸入位置	反應類型	生物意義詮釋
	輸出位置	計算物件	
T ₁	Fas ligand,	同二聚反應	將已定義的 Fas ligand 同質雙體形成三聚合物的聚合反應。
	Fas ligand trimer,	Petri Net	
T ₂	Fas ligand trimer, Fas receptor,	結合反應	此乃被配位體引誘而結合成複合物的結合反應，該反應觸發的條件是 Fas ligand trimer > 0。
	Ligand-receptor Complex,	Petri Net	
T ₃	Ligand-receptor Complex,	結合反應	此乃被配位體引誘而結合成複合物的結合反應，該反應觸發的條件是 Ligand-receptor Complex > 0。
	FADD, LF Complex,	Petri Net	
T ₄	LF Complex, Proaspase-8,	結合反應	此乃被配位體引誘而結合成複合物的結合反應，該反應觸發的條件是 LF Complex > 0。
	DISC,	Petri Net	
T ₅	DISC,	分解反應	DISC 複合物被分開成二個小分子的分解反應，但因 DISC 連接二個生化反應(分解與酵素化反應)，為防止多重路徑中資源搶奪問題，故將此反應以 化學平衡解 模擬。
	Caspase-8, Complex without Caspase-8,	化學平衡解	
T ₆	DISC,	酵素化反應	DISC 基質經由酵素(Caspase-8)作用而生成產物，而其中的生化反應不耗損任何酵素。
	DISC Complex,	酵素動力學	

轉置	輸入位置	反應類型	生物意義詮釋
	輸出位置	計算物件	
T ₇	Proaspase-8,	酵素化反應	Proaspase-8 經由酵素(Caspase-8)作用而生成產物，而其中的生化反應不耗損任何酵素。
	Proc-8 Complex,	酵素動力學	
T ₈	Proaspase-3,	酵素化反應	Proaspase-3 經由酵素(Caspase-8)作用而生成產物基質，而其中的生化反應不耗損任何酵素。
	Caspase-3,	酵素動力學	
T ₉	Bid,	酵素化反應	Bid 基質經由酵素(Caspase-8)作用而生成產物基質，而其中的生化反應不耗損任何酵素。
	Bid C terminal,	酵素動力學	
T ₁₀	Bid C terminal,	易位反應	Bid C terminal 基質由細胞質移動到粒腺體的位移反應。
	Bid C terminal,	Petri Net	
T ₁₁	ApoptosisS,	化學反應	反應基質轉換成產物基質的化學反應過程。
	Bax,	化學平衡解	
T ₁₂	Bax,	易位反應	Bax 基質由細胞質移動到粒腺體的位移反應。
	Bax,	Petri Net	
T ₁₃	Bax, Bid C terminal,	結合反應	此乃被配位體引誘而結合成複合物的結合反應，該反應觸發的條件是 Bid C terminal > 0。
	Bid/Bax Complex,	Petri Net	
T ₁₄	Bid/Bax Complex,	化學反應	反應基質轉換成產物基質的化學反應過程。經由此反應，Cytochrome C 將從粒腺體中被釋放至細胞質。
	Cytochrome C,		
T ₁₅	Cytochrome C	化學平衡解	
	Apaf-1, dATP/ATP, H ₂ O,	化學反應	反應基質轉換成產物基質的化學反應過程。
Apaf-1*, dADP/ADP, Pi,	化學平衡解		
T ₁₆	Apaf-1*, Cytochrome C,	同二聚反應	將已定義的同質雙體形成多聚合物的聚合反應
	AC Multimer,	Petri Net	

轉置	輸入位置	反應類型	生物意義詮釋
	輸出位置	計算物件	
T ₁₇	AC Multimer, Proaspase-9,	結合反應	此乃被配位體引誘而結合成複合物的結合反應, 該反應觸發的條件是 AC Multimer > 0。
	PAC Multimer,	Petri Net	
T ₁₈	PAC Multimer,	分解反應	PAC Multimer 複合物被分開成二個小分子的分解反應。
	Multimer without Caspase-9, Caspase-9,	Petri Net	
T ₁₉	Proaspase-9,	酵素化反應	Proaspase-9 經由酵素(Caspase-9)作用而生成產物, 而其中的生化反應不耗損任何酵素。
	Proc-9 Complex,	酵素動力學	
T ₂₀	Proaspase-3,	酵素化反應	Proaspase-3 經由酵素(Caspase-9)作用而生成產物, 而其中的生化反應不耗損任何酵素。
	Caspase-3,	酵素動力學	
T ₂₁	Proaspase-3,	酵素化反應	Proaspase-3 經由酵素(Caspase-3)作用而生成產物, 而其中的生化反應不耗損任何酵素。
	Proc-3 Complex,	酵素動力學	
T ₂₂	DFP,	酵素化反應	DFP 經由酵素(Caspase-3)作用而生成產物基質, 而其中的生化反應不耗損任何酵素。
	DFP45-1, DFP45-2, DFP45-3, DFP40,	酵素動力學	
T ₂₃	DFP40,	同二聚反應	將已定義的 DFP40 同質雙體形成寡聚物的聚合反應。
	DFP40 oligomer	Petri Net	
T ₂₄	DNA,	酵素化反應	DNA 經由酵素(DFP40 Oligomer)作用而生成產物, 而其中的生化反應不耗損任何酵素。
	DNA Fragment,	酵素動力學	
T ₂₅	DISC Complex,	分解反應	DISC Complex 複合物被切開成小分子的分解反應。
	Caspase-8,	Petri Net	

轉置	輸入位置	反應類型	生物意義詮釋
	輸出位置	計算物件	
T ₂₆	Proc-8 Complex, Caspase-8,	分解反應 Petri Net	Proc-8 Complex 複合物被切開成小分子的分解反應。
T ₂₇	Proc-9 Complex, Caspase-9,	分解反應 Petri Net	Proc-9 Complex 複合物被切開成小分子的分解反應。
T ₂₈	Proc-3 Complex, Caspase-3,	分解反應 Petri Net	Proc-3 Complex 複合物被切開成小分子的分解反應。
T ₂₉	Fas ligand,	初始化反應 初始化轉置	藉由初始化反應轉置的啟動，將 Fas ligand 的系統資源傳入該輸出位置。
T ₃₀	Fas receptor,	初始化反應 初始化轉置	藉由初始化反應轉置的啟動，將 Fas receptor 的系統資源傳入該輸出位置。
T ₃₁	FADD,	初始化反應 初始化轉置	藉由初始化反應轉置的啟動，將 FADD 的系統資源傳入該輸出位置。
T ₃₂	Proaspase-8,	初始化反應 初始化轉置	藉由初始化反應轉置的啟動，將 Proaspase-8 的系統資源傳入該輸出位置。
T ₃₃	Bid,	初始化反應 初始化轉置	藉由初始化反應轉置的啟動，將 Bid 的系統資源傳入該輸出位置。
T ₃₄	Proaspase-3,	初始化反應 初始化轉置	藉由初始化反應轉置的啟動，將 Proaspase-3 的系統資源傳入該輸出位置。
T ₃₅	ApoptosisS,	初始化反應 初始化轉置	藉由初始化反應轉置的啟動，將 ApoptosisS 的系統資源傳入該輸出位置。
T ₃₆	Cytochrome C,	初始化反應 初始化轉置	藉由初始化反應轉置的啟動，將 Cytochrome C 的系統資源傳入該輸出位置。

轉置	輸入位置	反應類型	生物意義詮釋
	輸出位置	計算物件	
T ₃₇		初始化反應	藉由初始化反應轉置的啟動，將 Apaf-1 的系統資源傳入該輸出位置。
	Apaf-1,	初始化轉置	
T ₃₈		初始化反應	藉由初始化反應轉置的啟動，將 H ₂ O 的系統資源傳入該輸出位置。
	H ₂ O,	初始化轉置	
T ₃₉		初始化反應	藉由初始化反應轉置的啟動，將 dATP/ATP 的系統資源傳入該輸出位置。
	dATP/ATP,	初始化轉置	
T ₄₀		初始化反應	藉由初始化反應轉置的啟動，將 Proaspase-9 的系統資源傳入該輸出位置。
	Proaspase-9,	初始化轉置	
T ₄₁		初始化反應	藉由初始化反應轉置的啟動，將 DFF 的系統資源傳入該輸出位置。
	DFF,	初始化轉置	
T ₄₂		初始化反應	藉由初始化反應轉置的啟動，將 DNA 的系統資源傳入該輸出位置。
	DNA,	初始化轉置	

資料來源：本研究整理自 Chen Li, 2007

4.3 參數設定

本次細胞凋亡模擬的計算物件以文獻[29]所研究之 Time Petri Net 為基礎，初始轉置、化學平衡解和酵素動力學為輔。各反應轉置的射線權重如表格 5 所示，各基質位置的初始值如表格 6 所示，而各反應轉置的延遲時間如表格 7 所示。計算物件的參數設定方面，化學平衡解的 delta 參數預設為 -30，以使 99% 的反應式向右進行，減少與 Time Petri Net 的誤差。同理，酵素動力學的 Keq 參數預設為 1000，以使 99% 的反應式向右進行。除此之外，酵素動力學的時間切片調控問題，倘若將時間切割得太細微，將造成耗費系統 CPU 與記憶體資源的代價；倘若時間切割得太粗略，則又將造成模擬結果的不精確，故將其切為 1/650，亦即每秒執行 650 次反應。

表格 5 Time Petri Net 模型中假設之細胞凋亡射線權重值²

轉置編號 t_i	輸入位置名稱	輸入射線權重	輸出位置名稱	輸出射線權重
t_1	Fas ligand	3		
t_2	Fas receptor	3		
t_{16}	Cytochrome C	8		
	Apaf-1*	8		
t_{17}	Proaspase-9	8		
t_{18}			Caspase-9	8
t_{23}	DFF40	4		

資料來源：本研究整理自 Chen Li, 2007

² 未標示射線權重者，其值均預設為 1。

表格 6 初始化反應給予輸出位置之預設代幣值³

位置編號 p _i	生物基質名稱	初始代幣數值
p ₁	Fas Ligand	6
p ₃	Fas receptor	6
p ₅	FADD	6
p ₇	Proaspase-8	7
p ₁₃	Proaspase-3	28
p ₁₄	Bid	8
p ₁₇	ApoptosisS	8
p ₂₁	Cytochrome C	8
p ₂₃	Apaf-1	8
p ₂₄	H ₂ O	8
p ₂₅	dATP/ATP	8
p ₃₀	Proaspase-9	9
p ₃₇	DFP	4
p ₄₃	DNA	10

資料來源：本研究整理自 Chen Li, 2007

³ 未標示初始代幣數值者，其值均預設為 1。

表格 7 Time Petri Net 模型中假設之轉置延遲時間⁴

轉置編號 t_i	生物反應類型	延遲時間
t_5	分解反應	2
t_6	酵素化反應	2
t_8	酵素化反應	1.5
t_{16}	同二聚反應	8
t_{17}	結合反應	8
t_{18}	分解反應	8
t_{19}	酵素化反應	8
t_{20}	酵素化反應	1.5
t_{21}	酵素化反應	1.5
t_{23}	同二聚反應	4

資料來源：本研究整理自 Chen Li, 2007

⁴ 未標示延遲時間者，其值均預設為 1。

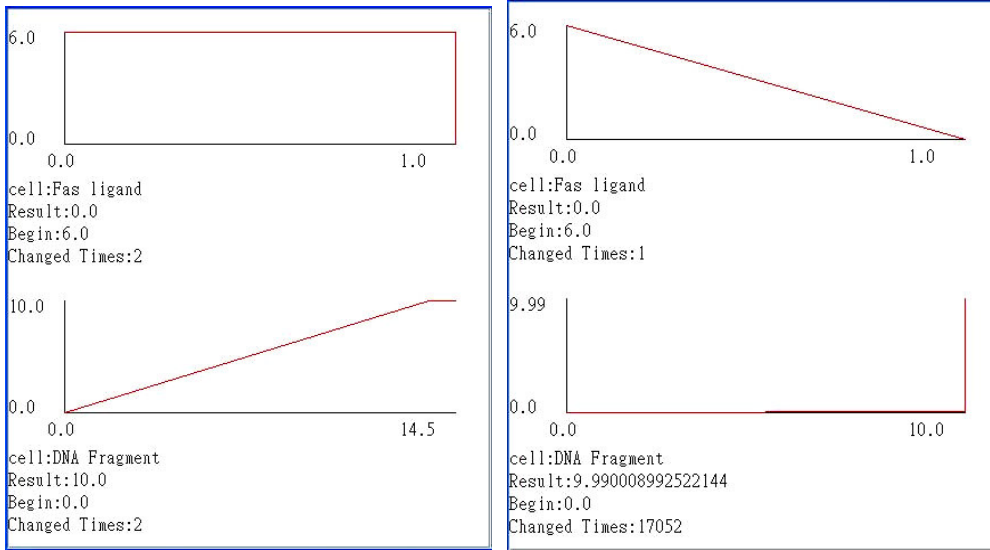
4.4 模擬結果

文獻[29]以 Cell Illustrator[4]此一軟體工具模擬 Petri Net 模型時，因為圖形化使用界面的拖曳方式操作，使單純建置圖形化界面(不包含轉置函數之計算)，就耗費二小時的時間。另外，該文雖然提出多重路徑選擇時，將每一路徑的觸發規則，設為相同觸發機率的演算法，但是以本系統模擬時，卻發生資源搶奪情況，究其原因，應該是文獻假設代幣全數到齊後，才能**依序**觸發轉置反應，而本系統一開始就將所有可執行計算的轉置放置於佇列中，使之可動態連結所需使用的射線資源，所以並非依轉置順序模擬的計算方法。

為解決多路徑選擇時，單一路徑搶奪所有資源的問題，模擬時可以選擇使用雙向反應的酵素動力學或單向反應的化學平衡解，取代 Petri Net 的模擬計算。此時，比較此二種方法，又可發現，酵素動力學的時間切片，時間切割愈細微，模擬結果愈精確，但相對地，也將付出耗用 CPU 與記憶體資源等代價。

4.4.1 Fas ligand 誘發細胞凋亡之信號傳導路徑

圖 20 (a) 所示，是全部以 Petri Net 計算物件模擬外在性誘發因子 Fas ligand 之細胞凋亡傳導路徑，Fas ligand 於 1 秒時，濃度到達 0，而代表細胞死亡的 DNA Fragment 則於 14 秒時，開始增加其濃度，這意味著細胞凋亡的信號如文獻[29]般成功被傳達。相對地，圖 20 (b) 顯示使用初始化轉置、Petri Net、化學平衡解、酵素動力學之混合計算物件模擬細胞凋亡，同樣地，Fas ligand 於 1 秒時，完全被反應成三聚合物，而經過 10 秒後，DNA 片段化的現象開始產生，這亦彰顯細胞凋亡的信號路徑成功被傳達至細胞核。



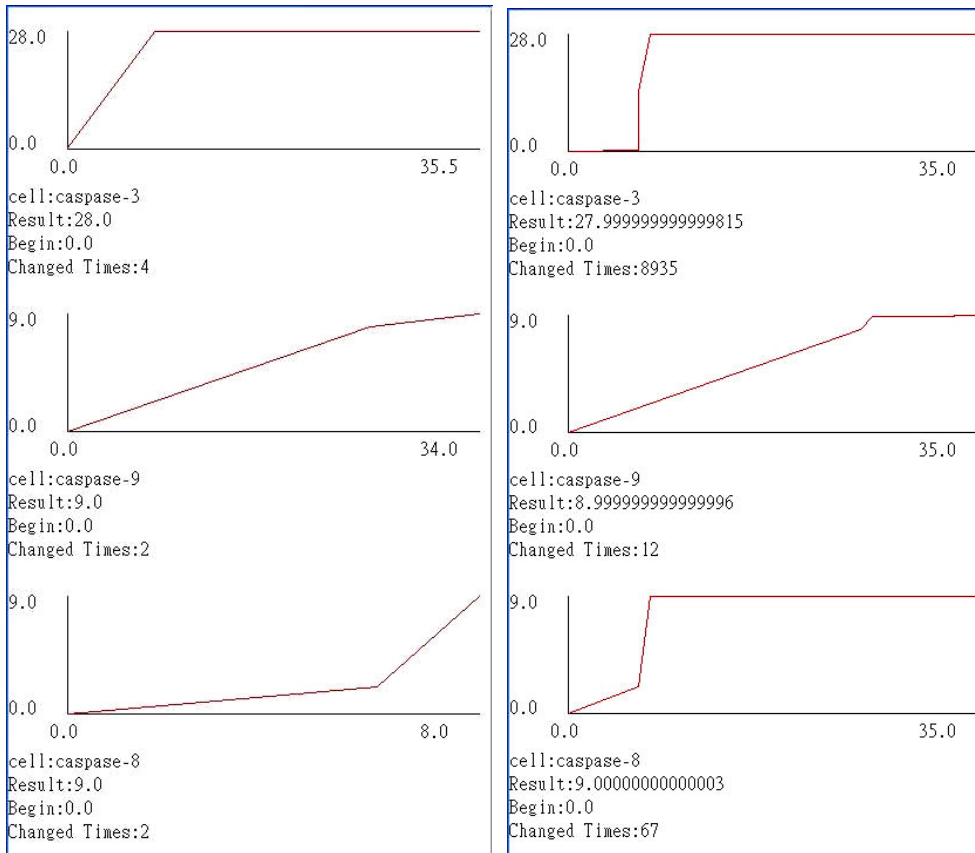
(a) Petri Net 計算物件模擬之結果

(b) 混合計算物件模擬之結果

圖 20 Fas ligand 及 DNA Fragment 模擬之結果

資料來源：本研究整理

圖 21 (a) 所示，乃全部以 Petri Net 計算物件模擬 Caspase 的結果，如文獻[29]所模擬般，三個酵素被活化的順序為 Caspase-8 最早被活化，而後 Caspase-3 被活化，最後被活化者，則為 Caspase-9。其中，Caspase-9 因為必須經歷粒腺體的死亡路徑，所以較 Caspase-3 晚被活化。至於圖 21 (b) 則顯示使用混合計算物件模擬 Caspase 的結果，二者結果所差無幾。



(a) Time Petri Net 模擬之結果

(b) 混合計算物件模擬之結果

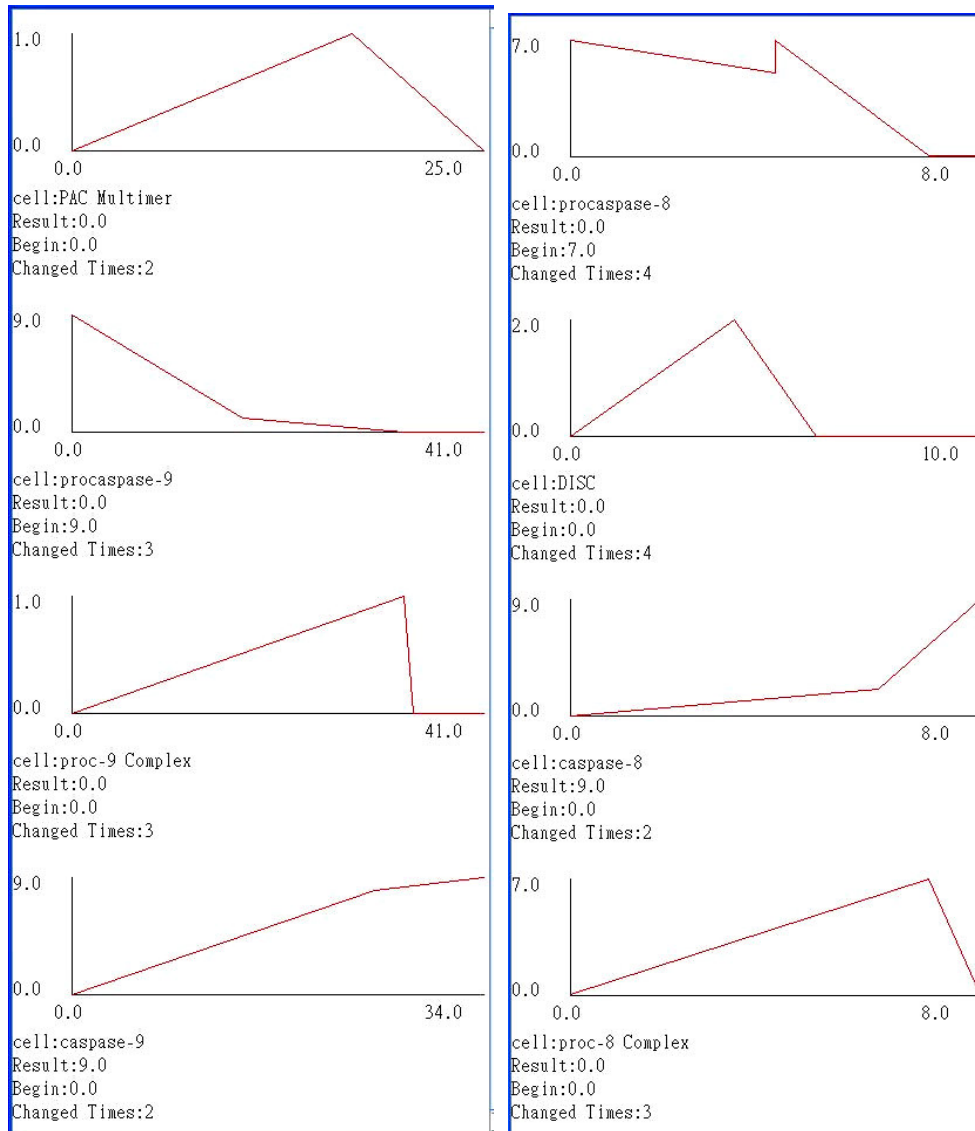
圖 21 Caspase 家族模擬之結果

資料來源：本研究整理

4.4.2 細胞凋亡多重路徑之模擬結果

圖 22 顯示二個單純以 Petri Net 計算物件模擬多重路徑的結果。(a) 顯示以 Proaspase-9 為輸入位置的二條反應路徑：一是必須以 8 個單位的 Proaspase-9 為輸入位置，經由 t_{17} 轉置反應後，形成輸出位置為 1 單位的 PAC Multimer 路徑；一是經過 t_{19} 轉置而形成 1 單位 Proc-9 Complex 基質的生物反應路徑。因為經由一次 t_{17} 的轉置反應後，Proaspase-9 基質僅剩下 1 單位的代幣濃度，不足以進行第二次的 t_{17} 的反應，故 PAC Multimer 基質經由 t_{18} 轉置，生成 Caspase-9 基質，而此 Caspase-9 的酵素基質，才得以催化輸入位置為 1 單位 Proaspase-9 的 t_{19} 轉置觸發。經由此一迴圈反應，細胞凋亡的信號可以順利傳導到下一階段，而無濃度資源搶奪的問題。

圖 22 (b) 顯示以 Proaspase-8 為輸入位置的二條生物反應路徑：一是經由 t_4 轉置反應，消耗 2 單位代幣濃度的 DISC 輸出位置；一是經過 t_7 轉置而形成 Proc-8 Complex 基質的反應路徑。因為 DISC 基質僅消耗 2 單位的代幣濃度，而且， t_7 轉置必須等待 t_4 轉置下游的酵素產物形成後，才得以觸發，將剩餘的 Proaspase-8 濃度消耗殆盡。故此一細胞凋亡的信號反應亦無代幣資源搶奪的問題。



(a) Time Petri Net 模擬之結果

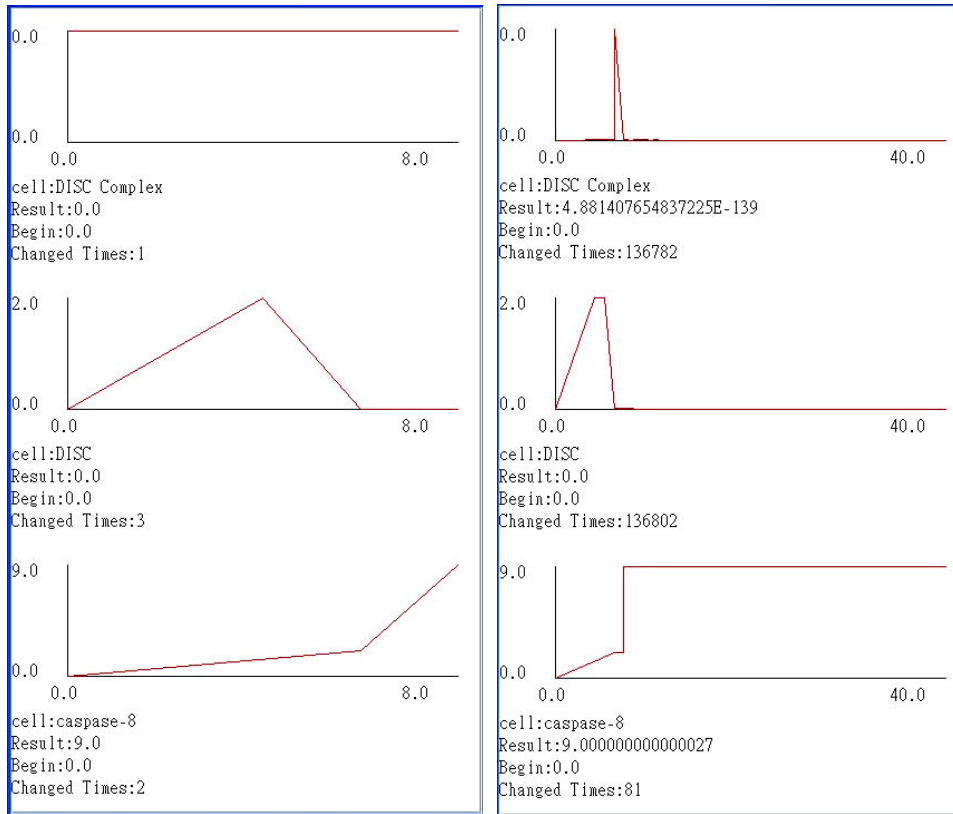
(b) 混合計算物件模擬之結果

圖 22 無資源搶奪之多重路徑選擇

資料來源：本研究整理

圖 23 (a) 顯示單以 Petri Net 計算物件模擬 DISC 多重路徑選擇的結果。如上列圖 19 所示，DISC 連接二條反應路徑可供選擇：一是經由 t_5 轉置反應後，形成 Caspase-8 酵素的反應路徑；一是經由 Caspase-8 觸發而產生 DISC Complex 基質的 t_6 轉置路徑，二者延遲時間相同，欲消耗資源數亦相同，當選擇某一路徑反應後，另一路徑將發生資源不足而中斷生物反應的情況。

圖 23 (b) 則顯示運用 Petri Net、化學平衡解與酵素動力學混合的計算物件模擬結果。化學平衡解雖然同 Petri Net 一般，都不屬於雙向振盪的反應，但化學平衡解可以利用 delta 參數調控最終平衡狀態，言下之意，所連結的每一反應路徑都可以參與反應，所以細胞凋亡的信號可以延續，無資源搶奪問題。而酵素動力學計算物件亦可處理此問題，然則，其模擬計算過程，需耗費大量 CPU 及記憶體資源，故模擬原則之處理上， t_6 因屬酵素化反應類型，故以酵素動力學計算物件模擬之，而 t_5 則以化學平衡解計算物件處理。



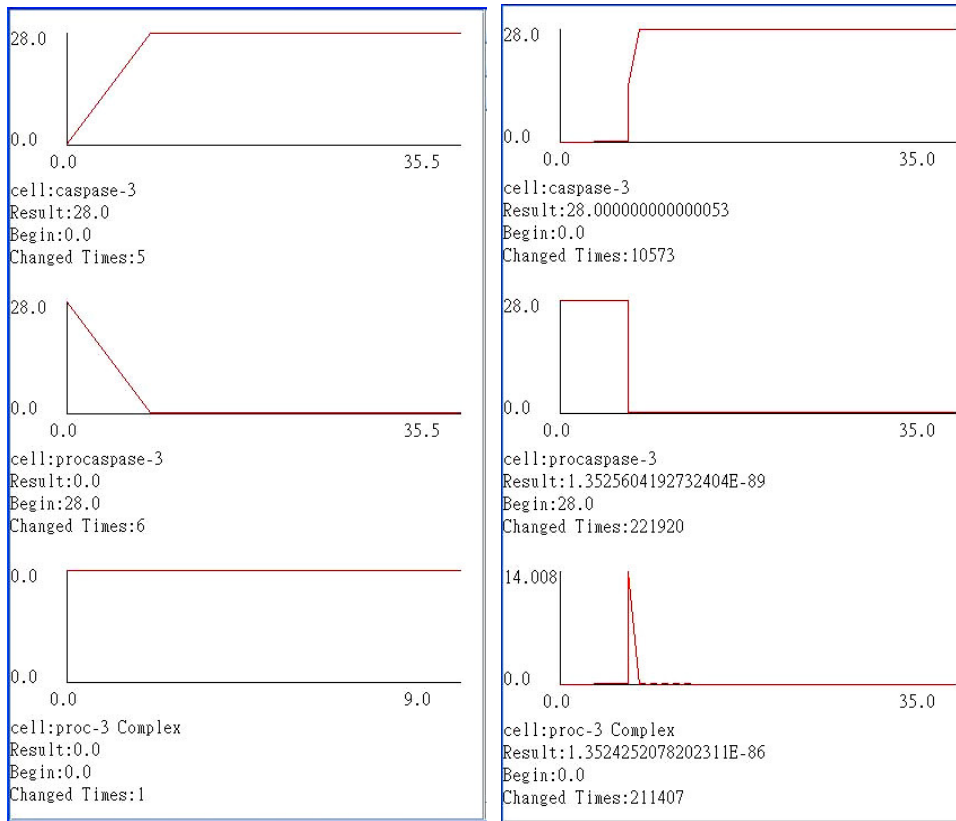
(a) Time Petri Net 模擬之結果

(b) 混合計算物件模擬之結果

圖 23 DISC 多重路徑選擇之結果

資料來源：本研究整理

圖 24 (a) 顯示單以 Petri Net 計算物件模擬 Proaspase-8 多重路徑選擇的結果。如上列圖 19 所示，Proaspase-8 分別連接 t_8 、 t_{20} 、與 t_{21} 三條反應路徑，由圖中可發現 t_{21} 轉置反應的 Proc-8 Complex 基質，並無參與反應。圖 24 (b) 乃視實際生物反應類型而直接套用酵素動力學計算物件的模擬結果，雖然因為每秒反應 650 次的時間切割設定，使得反應次數爆增，但是其模擬曲線結果與 Petri Net 相近且無多重路徑選擇的搶奪現象。



(a) Time Petri Net 模擬結果

(b) 酵素動力學模擬結果

圖 24 Proaspase-8 多重路徑選擇結果

資料來源：本研究整理

第五章 結論與未來方向

5.1 結論

Java 的物件導向模擬環境，具有自動連結射線，自訂 Transition 的優點，所以可以解決混合式生物路徑的模擬困難。使得新增、修改、刪除生物反應路徑中的任一基質，不再是困難的一件事。只要專家學者將反應路徑建立完全，系統即可自動整合所需基質，不必以拖曳圖形或重新推算微分方程式等方式，重新建模。

雖然文獻[29]指出運用 Cell Illustrator[4]此一模擬軟體，實作 Time Petri Net 的模型於細胞自毀的信號傳導，確實可以正確模擬出接近實驗數據的結果，然，吾等重建模型後，卻發生多重路徑選擇所造成的資源搶奪問題，因而可知，僅使用單一 Petri Net 計算物件模擬混合式的生物反應路徑是不可行的。

本論文提出以物件導向之模擬平台[65]，搭配初始化轉置、Petri Net、化學平衡解[64]以及酵素動力學[64]等四種計算物件，或可節省對現今數十種模擬模型的學習時間，又可較為精確地模擬出混合式生物反應路徑的觀點。隨後並確實以包含基因、酵素、與信號傳導等三路徑元素的細胞凋亡案例來驗證此一觀點。

雖然此路徑僅由 Fas 所誘導，且不含抑制劑的模擬，然，從圖論角度視之，此四大計算物件之運用，不僅包含所有合法的 Petri Net 圖形，亦可更真實地貼近現實生物環境，而不必再受限於 Petri Net 模型之限制。

目前 Transition 尚無開發通用之酵素動力學抑制反應的計算物件，不過，專家學者建模時，仍可自行分析生物路徑圖或依據模擬情況需要，選擇最適當的計算物件進行建模，此乃非常具有彈性的模擬方式。

5.2 未來方向與展望

目前，因實驗數據取得困難，所以尚未模擬出完整的細胞凋亡路徑，他日若取得相關數據資料，應可擴大細胞凋亡的模擬範圍。

筆者以四大計算物件分析 KEGG 路徑圖[25]時得知，KEGG 的虛線生物路徑圖，乃截至目前為止尚未清楚瞭解其中之生物機制反應者，可能是間接反應亦可能是未知反應，倘若使用文獻[65]所提的系統平台，配合四大計算物件的物件導向模擬，以電腦計算預測能力來分析其中可能之分子互動狀態，或可令生化學家發現未知的生物現象。

参考文献

- [1] Ashkenazi, A., and Dixit, V.M., (1998). "Death receptors: signaling and modulation," *Science*, 281 1305-1308.
- [2] Barry, M.A., Behnke, C.A. and Eastman, A., (1990). "Activation of programmed cell death (apoptosis) by cisplatin, other anticancer drugs, toxins and hyperthermia," *Biochem. Pharmacol*, 40 2353-2362.
- [3] Bortner, C.D., and Cidlowski, J.A., (2002). "Cellular mechanisms for the repression of apoptosis," *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol*, 42 259-81.
- [4] Cell Illustrator : <http://genomicobject.net/member3/index.html>
- [5] Chen, M. and Hofestaedt, R., (2003). "Quantitative Petri net model of gene regulated metabolic networks in the cell," *In Silico Biology*, 3(3) 347-365.
- [6] Delgado, L., Liao, L.C., (1995). "Control of metabolic pathways by time-scale separation," *Biosystems*, 36 55-70.
- [7] Doi, A., Nagasaki, M., Matsuno, H., and Miyano, S., (2006). "Simulation based validation of the p53 transcriptional activity with hybrid functional Petri Net," *In Silico Biology*, 6 001.
- [8] Eastman, A., and Rigas, J.R., (1999). "Modulation of apoptosis signaling pathways and cell cycle regulation," *Seminars in Oncology*, 26 7-16.
- [9] Friedman, N., Linial, M., Nachman, I., and Pe'er, D., (2000). "Using Bayesian networks to analyze expression data," *In Proceedings of the Fourth Annual International Conference on Computational Molecular Biology, RECOMB 2000*, New York, N.Y. ACM Press.
- [10] Goss, P.J.E., Peccouds, J. (1998). "Quantitative modeling of stochastic systems in molecular biology by using stochastic Petri Nets," *PNAS*, 6750.
- [11] Hardy, S., Robillard, P.N., (2004). "Modeling and simulation of molecular biology

- systems using Petri Nets: modeling goals of various approaches,” *Journal of bioinformatics and computational biology*, 2(4) 595-613.
- [12] Hatzimanikatis, V., Emmerling, M., Saucer, U., Bailey, J.E., (1998). “Application of Mathematical tools for Metabolic design of microbial ethanol Production,” *Biotech. Bioengg*, 58 154-161.
- [13] Hayes-Roth, F., Waterman, D.A. and Lenat, D.B., (1983). *Building Expert Systems*. Addison-Wesley, London.
- [14] Heiner, M. and Koch, I., (2004). “Petri Net based model validation in systems biology,” *LNCS*, 3099 216-237.
- [15] Heiner, M., Koch, I. and Will, J., (2004). “Model validation of biological pathways using Petri Nets, demonstrated for apoptosis,” *Biosystems*, 75 15-28.
- [16] Hidde de Jong, (2002). “Modeling and simulation of genetic regulatory systems: A literature review,” *Journal of Computational Biology*, 9(1) 67-103.
- [17] Hofestädt R., (1994). “A Petri Net application to model metabolic processes,” *J. System Analysis, Modeling Simulation*, 16 113-122.
- [18] Hofestädt, R., Thelen, S., (1998). “Quantitative modeling of biochemical networks,” <http://www.bioinfo.de/isb/1998/01/0006/main.html>.
- [19] Hu, Y., Benedict, M.A., Ding, L. and Nunez, G., (1999). “Role of cytochrome c and dATP/ATP hydrolysis in Apaf-1-mediated caspase-9 activation and apoptosis,” *EMBO J*, 18 3586-3595
- [20] Jacob, F., Monod, J., (1961). “Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins,” *Journal of Molecular Biology*, 3 318-356.
- [21] Jacobson, M.D., Weil, M. and Raff, M.C., (1997). “Programmed cell death in animal development,” *Cell*, 88 347-354
- [22] Jamshidi, N., Edwards, J. S., Fahland, T., Church, G.M., Palsson, B.O., (2001).

- “Dynamic simulation of the human red blood cell metabolic network,”
Bioinformatics, 17 286-287.
- [23] Kanehisa, M. and Goto, S., (2000). “KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes,” *Nucleic Acids Research*, 28(1) 27-30.
- [24] Kauffman, S.A., (1969). “Metabolic stability and epigenesis in randomly constructed genetic nets,” *Journal of Theoretical Biology*, 22 437-467.
- [25] KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes.
http://www.genome.ad.jp/dbget-bin/www_bget?pathway+hsa04210
- [26] Kolpakov, F.A., Ananko, E.A., Kolesov, G.B. and Kolchanov, N.A., (1999).
“GeneNet: A gene network database and its automated visualization,”
Bioinformatics, 14(6) 529-537.
- [27] Lee, D.Y., Zimmer, R., Lee, S.Y., Hanisch, D. and Park, S., (2004). “Knowledge representation model for system-level analysis of signal transduction networks,”
Genome Informatics, 15(2) 234-243.
- [28] Lee, Y.K., and Park, S.J., (1993) “OPNets: an object-oriented high-level Petri net model for real-time system modeling,” *J. Systems Software*, 20(99) 69-86.
- [29] Li, C., Ge, Q.W., Nakata, M., Matsuno, H. and Miyano, S., (2007). “Modelling and simulation of signal transductions in an apoptosis pathway by using timed Petri nets,” *J Biosci*, 32(1) 113-27.
- [30] Li, C., Suzuki, S., Ge, Q.W., Nakata, M., Matsuno, H. and Miyano, S., (2006).
“Structural modeling and analysis of signaling pathways based on Petri Nets,” *J. Bioinformatics and Computational Biology*, 4(5), 1119-1140.
- [31] Luo, X., Budihardjo, I. and Zou, H., (1998). “Slaughter C and Wang X Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors,” *Cell*, 94 481-490

- [32] Matsuno, H., Doi, A., Nagasaki, M. and Miyano, S., (2000). "Hybrid Petri net representation of gene regulatory network," *Pacific Symp. on Biocomputing*, 5 338-349.
- [33] Matsuno, H., Inouye, ST., Okitsu, Y., Fujii, Y., and Miyano, S., (2006). "A new regulatory interaction suggested by simulations for circadian genetic control mechanism in mammals," *Journal of bioinformatics and computational biology*, 4(1) 139-153.
- [34] Matsuno, H., Li, C. and Miyano, S., (2006). "Petri Net based description for systematic understanding of biological pathways," *IEICE Transactions on Fundamentals of Electronics, Communications and Computer Sciences*, 89-A 3166-3174
- [35] Matsuno, H., Tanaka, Y., Aoshima, H., Doi, A., Matsui, M. and Miyano, S., (2003). "Biopathway representation and simulation on hybrid functional Petri net," *In Silico Biology*, vol.3, no.3, pp.389-404.
- [36] Nagasaki M, Doi A, Matsuno H, Miyano S, (2004). "A versatile Petri Net based architecture for modeling and simulation of complex biological processes," *Genome Informatics*, 15(1) 180-197.
- [37] Nagasaki, M., Doi, A., Matsuno, H. and Miyano, S., (2005). "Computational modeling of biological processes with Petri Net-based architecture," *Bioinformatics Technologies* (Yi-Ping Phoebe Chen (Ed.)) , 179-242.
- [38] Nagata, S., (1997). "Apoptosis by death factor," *Cell*, 88 355-365
- [39] Peleg, M., Rubin, D., and Altman, R.B., (2005). "Using Petri Net tools to study properties and dynamics of biological systems," *Journal of the American Medical Informatics Association*, 12(2) 181-199.
- [40] Peterson J.L., (1981). "Petri Net theory and the modeling of systems,"

Prentice-Hall, Englewood Cliffs, N. J.

- [41] Petri, C.A., (1962). "Kommunikation mit Automaten," *Ph.D. - 85 -Dissertation, University of Bonn, Bonn.*
- [42] Pissara, P.N., Nielsen, J., Bazin, M.J., (1996). "Pathway kinetics and metabolic control analysis of a high-yielding strain of *fenicillium chrysogenum* during fed batch cultivations," *Biotechnol Bioeng*, 51 168-176.
- [43] Raff, M.C., (1992). "Social control on cell survival and cell death," *Nature*, 356 397-400
- [44] Ramakrishna, R., Edwards, J.S., McCulloch, A., Palsson, B.O., (2001). "Flux-balance analysis of mitochondrial energy metabolism: consequences of systemic stoichiometric constraints," *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 280: R695-R704.
- [45] Reddy V.N., Mavrovouniotis M.L., and Liebman M.N., (1993). "Petri Net representations in metabolic pathways," *Proc. 1st International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology*, 328-336.
- [46] Reddy, V.N., Libeman, M.N., Mavrovouniotis, M.L., (1996). "Qualitative analysis of biochemical reaction systems," *Computational. Biology Medicine*, 9 26-34.
- [47] Reed, J.C., (2000). Tomaselli, K.J., "Drug discovery opportunities from apoptotic research," *Curr. Opin. Biotechnol*, 11 586-92
- [48] Saleh, A., Srinivasula, S.M., Acharya, S., Fishel, R. and Alnemri, E.S., (1999). "Cytochrome c and dATP-mediated oligomerization of Apaf-1 is a prerequisite for procaspase-9 activation," *J Biol Chem*, 274 17941-17945
- [49] Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K.J., Debatin, K.M., Krammer, P.H. and Peter, M.E., (1998). "Two CD95 (APO-1/Fas) signalling pathways," *EMBO J*, 17 1675-1687

- [50] Schuster, S., Bandekar, T., and Fell, D.A., (1999). "Detection of elementary flux modes in biochemical networks: A promising tool for pathway analysis and metabolic engineering," *Trends Biotechnol*, 17(2) 53-60.
- [51] Sibertin-Blane, C. and Bastide, R., (1990) "Object-oriented Structuration for High Level Petri Nets," *11th Conference of Application and Theory of Petri Nets*.
- [52] Stephanopoulos, G.N., (1998). Aristidou, A.A., Nielsen, J., "Metabolic Engineering," *Academic Press*, NY.
- [53] Takai-Igarashi, T., (2005). "Ontology based standardization of Petri Net modeling for signaling pathways," *In Silico Biol.*, 5(47) 529-536.
- [54] Thompson, C.B., (1995). "Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease," *Science*, 267 1456-62.
- [55] Troncale, S., Tahiri, F., Campard, D., Vannier, J-P., and Guespin, J., (2006). "Modeling and simulation with hybrid functional Petri Nets of the role of interleukin-6 in human early haematopoiesis," *Pac. Symp. Biocomput.*, 11 427-438.
- [56] WebCell :
http://webcell.kaist.ac.kr:8017/webcell/index.jsp?menu=kinetic_type#menu3
- [57] Weber, C.H., & Vincenz, C., (2001). "A docking model of key components of the DISC complex: death domain superfamily interactions redefined," *FEBS Lett*, 492 171-176.
- [58] White, E., (1996). "Life, death and the pursuit of apoptosis," *Genes Dev*, 10 1-15.
- [59] Widlak, P., Lanuszewska, J., Cary, R.B. and Garrard, W.T., (2003). "Subunit structures and stoichiometries of human DNA fragmentation factor proteins before and after induction of apoptosis," *J. Biol Chem*, 278 26915-26922
- [60] Wikipedia: 細胞凋亡.
<http://zh.wikipedia.org/w/index.php?title=%E7%BB%86%E8%83%9E%E5%87%>

- [61] Zevedei-Oancea, I. and Schuster, S., (2003). "Topological analysis of metabolic networks based on Petri Net theory," *In Silico Biology*, 3(3) 323-345.
- [62] Zou, H., Li, Y., Liu, X. and Wang, X., (1999). "An Apaf-1·Cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9," *J Biol Chem*, 274 11549-11556
- [63] 李允中、王小璠、蘇木春，模糊理論及其應用，全華，台北，2003年1月。
- [64] 陳智泉，運用化學平衡解與酵素動力學於代謝網路模擬之效果分析，國立暨南國際大學資訊管理研究所碩士論文，2008，未出版。
- [65] 蒲泰宏，模擬平台之設計與實作，國立暨南國際大學資訊管理研究所碩士論文，2008，未出版。
- [66] 蔡劍霞，以系統生物學修正 Petri Nets 於代謝網路之應用，國立暨南國際大學資訊管理研究所碩士論文，2005。

附錄一 縮寫對照表

細胞凋亡信號傳導之縮寫/中文對照表		
Apaf-1	Apoptotic protease activating factor 1	中風蛋白酵素啟動因子
ATP	Adenosine triphosphate	腺苷三磷酸
Bad	Bcl-XL/Bcl-2 associated death promoter	結合 Bcl-XL 與 Bcl-2 的死亡促進因子
Bax	Bcl-2 associated X protein	Bcl-2 結合 X 的蛋白
Bcl-2	B-Cell lymphoma 2	B 細胞淋巴瘤 2
Bid	Bcl-2 interacting domain	B 細胞淋巴瘤互動蛋白
Caspase	Cysteiny aspartate-specific protease	硫胱氨酸蛋白酶; 蛋白酶
dATP	Desoxyadenosine triphosphate	去氧腺苷三磷酸
DD	death domain	死亡區域
DED	death effector domain	死亡影響區域
DFF	DNA fragmentation factor	DNA 片段化因子
DFF40	40 kDa unit of DFF	分子量為 40,000 的 DFF 蛋白質
DFF45	45 kDa unit of DFF	分子量為 45,000 的 DFF 蛋白質
DISC	Death inducing signaling complex	死亡感應信號複合物
FADD	Fas associating protein with death domain	Fas 偶聯死亡區域蛋白
Fas	Fas receptor	Fas 受體
FasL	Fas ligand	Fas 因子
IL-1	Interleukin 1	白血球間素 1
TNF	Tumor necrosis factor	腫瘤壞死因子
tBid	Truncated Bid	被截斷的 Bid