

私立中山醫學院營養科學研究所碩士論文

Graduate Institute of Nutritional Science

Master Thesis, Chung Shan Medical and Dental College

指導教授：陳暉雯博士

Advisor : Haw-Wen Chen, Ph.D.

n-3 及 n-6 脂肪酸調控苯乙基巴比妥酸誘發初代肝細胞細胞色素

P450 2B1 之表現

n-3 and n-6 fatty acids regulation of phenobarbital-induced cytochrome

P450 2B1 expression in primary rat hepatocyte culture

研究生：張 伶

Graduate student : Lin Chang

中華民國九十年七月

July, 2001

# 目 錄

## 摘要

前言.....1

文獻探討.....3

一、 生物體內解毒代謝系統.....3

二、 細胞色素 P450.....5

三、 Phenobarbital 與細胞色素 P450 2B1 表現.....8

四、 脂肪酸與細胞色素 P450 酵素活性.....11

五、 n-3 和 n-6 脂肪酸之生理作用.....12

六、 n-3 和 n-6 脂肪酸與 PGE<sub>2</sub> 合成之關係.....15

七、 前列腺素 E<sub>2</sub> 生理作用.....16

八、 PGE<sub>2</sub> 與 cAMP 合成之關係.....18

九、 Cyclic AMP 與 phenobarbital 誘發細胞色素 P450 2B 之表現.....20

實驗動機.....22

材料及方法.....23

一、 實驗材料.....23

1. 實驗動物.....23

2. 化學試劑.....23

二、實驗方法.....	27
(1) 肝細胞分離及培養.....	27
(2) 細胞處理.....	29
(3) 細胞存活率測定.....	31
(4) 細胞中脂肪酸組成分析.....	32
(5) 細胞色素 P450 2B1 蛋白質表現之分析.....	33
(6) 細胞色素 P450 2B1 mRNA 表現之分析.....	35
(7) 肝細胞 PGE <sub>2</sub> 分泌量之測定.....	40
三、統計分析.....	43
結果.....	44
n-3、n-6 脂肪酸添加對細胞脂肪酸組成之影響.....	44
添加不同濃度脂肪酸對肝細胞 LDH leakage 之影響.....	44
Indomethacin 對花生四烯酸影響 PB 誘發 CYP 2B1 蛋白質表現 之劑量關係.....	45
添加或不添加 indomethacin 對 n-3 及 n-6 脂肪酸影響 PB 誘發 CYP 2B1 蛋白質表現之影響.....	45
添加或不添加 indomethacin 對 n-3 及 n-6 脂肪酸影響 PB 誘發 CYP 2B1 mRNA 表現之影響.....	45
n-3 及 n-6 脂肪酸對肝細胞分泌 PGE <sub>2</sub> 能力之影響.....	46

結果圖表.....47

討論.....58

結論.....64

參考文獻.....65

## 摘要

苯乙基巴比妥酸(phenobarbital, PB)可以誘發肝臟CYP 2B 酵素活性。動物實驗發現，日糧中油脂的種類及含量會影響肝中 CYP450 酵素系統。前列腺素 E<sub>2</sub> 已知可透過細胞中 cAMP 的訊息傳遞路徑來調控多種細胞功能。n-3、n-6 脂肪酸因會影響前列腺素的合成，本實驗欲利用初代肝細胞培養模式來探討 n-3 及 n-6 PUFA 對 PB 誘發 CYP 2B1 表現之影響，同時觀察此影響是否與 PGE<sub>2</sub> 合成有關。實驗方法：由雄性 SD 大鼠肝臟分離出肝細胞，以 William's E medium 進行培養。於培養液中添加 50 μM LA (18:2, n-6)、AA (20:4, n-6)、EPA (20:5, n-3) 和 DHA (22:6, n-3)，觀察 n-3 及 n-6 PUFA 對 PB 誘發 P450 2B1 蛋白質及 mRNA 表現的影響。結果發現，培養液中添加 n-3 及 n-6 PUFA 以 AA (20:4, n-6) 在所有的脂肪酸中對於 PB 誘發 CYP 2B1 蛋白質表現最弱；但是 AA (20:4, n-6) 對於 PB 誘發 CYP 2B1 mRNA 表現與其他脂肪酸卻無差異。indomethacin 可提升 PB 誘發 CYP 2B1 蛋白質及其 mRNA 表現。以 PB 誘發初代肝細胞 CYP 2B1 表現，發現添加或不添加 indomethacin 對 n-3 及 n-6 PUFA 培養液中 PGE<sub>2</sub> 濃度沒有顯著影響。綜合以上結果我們推測，n-3 及 n-6 PUFA 對 PB 誘發 CYP 2B1 表現的影響可能與 PGE<sub>2</sub> 合成無關，而是另有其他機制參與。

關鍵詞：亞麻油酸、花生四烯酸、二十碳五烯酸、二十二碳六烯酸、  
苯乙基巴比妥酸、初代肝細胞培養、CYP450 2B1、前列腺素 E<sub>2</sub>

# 前 言

許多化學物質在體內都會經過生物轉化作用而被代謝，肝臟是生物體內主要的解毒代謝器官。解毒代謝過程分為兩個階段分別是 phase I 及 phase II。Phase I 階段經由氧化、還原及水解等作用改變化學物質的官能基進而增加其親水性以利代謝物可以直接排出體外或是進入 phase II 階段繼續代謝。Phase II 階段進行結合反應，將外來物質接上內生性的葡萄糖醛酸(glucuronic acid)、硫酸鹽(sulfate)和 glutathione 等高水溶性小分子,增加代謝產物之親水性以利迅速排出體外。

細胞色素 P450 屬於 phase I 系統，是生物體內代謝外來物質及內生性物質重要的酵素之一( Guengerich et al., 1991)。細胞色素 P450 同時具有解毒及代謝活化的雙重角色，除此它也具有氧化還原功能( Yang et al., 1998 )。

由過去研究結果得知，肝臟中 CYP 2B1 可被 PB 所誘發，此外許多飲食因子如維生素 E、蛋白質中的胺基酸(例如:色胺酸)、十字花科蔬菜中的 indoles 也被證實會影響細胞色素 P450 酵素活性。有學者提出日糧中油脂含量會影響肝中細胞色素 P450 酵素系統(Yoo, 1991)。另外，利用初代肝細胞研究指出 cAMP 在 PB 誘發 CYP 2B1 基因表

現的模式中扮演負向調控的角色(Sidhu, 1995), 胞 cAMP 是 ATP 經 adenylyl cyclase 作用而產生的。因此, n-3 及 n-6 PUFA 若能影響 cAMP 的產生, 就可能影響 PB 誘發肝臟 CYP 2B 的表現。有文獻指出, 脂肪細胞中 EPA 會抑制 adenylyl cyclase 活性, 降低胞內 cAMP 濃度(Tisdale, 1993)。Tanaka 等人(2000)也指出, PGE<sub>2</sub> 與細胞膜上 EP2 及 EP4 受體結合, 可透過 Gs-protein 刺激大鼠腎上腺的帶狀腎小球細胞中 adenylyl cyclase 活性, 進而增加胞內 cAMP 濃度。之前研究發現, 攝取 n-3 PUFA, 如 EPA (20:5, n-3)及 DHA (22:6, n-3)會降低 PGE<sub>2</sub> 的合成(Harris, 1996); 相反的, 若增加 n-6 PUFA 攝取, 如 AA (20:4, n-6)、LA (18:2, n-6)則會促進 PGE<sub>2</sub> 的合成(Simopoulos, 2000)。

因此, 本實驗利用 SD 大鼠初代肝細胞培養模式, 探討 n-3 及 n-6 PUFA 對 PB 誘發 CYP 2B1 表現之影響, 同時觀察此影響是否與 PGE<sub>2</sub> 合成有關。



# 文獻探討

## 一、生物體內解毒代謝系統

外來物質，可以經由皮膚、腸胃道、呼吸道等管道進入生物體，經吸收後，分佈到身體各部位造成不同程度的影響或經由代謝途徑排出體外。許多化學物質在體內都會經過生物轉化作用被代謝，肝臟是生物體內主要的解毒代謝器官，其他具有解毒代謝功能的器官還包括肺、胃、小腸、皮膚及腎臟等(Gram, 1980; Farrell, 1987; Krishna et al., 1994)。生物體內的解毒酵素系統又稱為生物轉換酵素系統 (biotransformation enzymes) 或藥物代謝系統。細胞中，解毒酵素系統主要分佈在內質網或細胞質中，少部分體(Williams, 1971) (Table 1)。

解毒代謝過程分為兩個階段分別是 Phase I 及 Phase II。Phase I 階段包括水解、還原、氧化反應。Phase I 階段所參與的酵素主要為 cytochrome P450、NADPH cytochrome P450 reductase、alcohol dehydrogenase 和 aldehyde dehydrogenase 及少數 monoamine oxidase, 經由氧化、還原及水解等作用改變化學物質的官能基進而增加其親水性以利代謝物可以直接排出體外或是進入 Phase II 階段繼續代謝。

Phase II 階段是進行結合反應，參與酵素包括 glutathione

S-transferase、UDP-glucuronosyl transferases、NAD(P)H:menadione oxidoreductase 等,將外來物質或 Phase 代謝產物接上內生性的葡萄糖醛酸(glucuronic acid)、硫酸鹽(sulfate)和 glutathione 等水溶性小分子,增加代謝產物之親水性以利迅速排出體外(Raymond et al., 1996) (Fig 1)。在體內的解毒酵素系統,因為生物種類的不同,其進行的反應和作用的結果亦會有所差異。

Table 1

General Pathways of Xenobiotic Biotransformation and Their Major Subcellular Location		
REACTION	ENZYME	LOCALIZATION
Phase I		
<i>Hydrolysis</i>	Carboxylesterase	Microsomes, cytosol
	Peptidase	Blood, lysosomes
	Epoxide hydrolase	Microsomes, cytosol
<i>Reduction</i>	Azo- and nitro-reduction	Microflora, microsomes, cytosol
	Carbonyl reduction	Cytosol
	Disulfide reduction	Cytosol
	Sulfoxide reduction	Cytosol
	Quinone reduction	Cytosol, microsomes
	Reductive dehalogenation	Microsomes
<i>Oxidation</i>	Alcohol dehydrogenase	Cytosol
	Aldehyde dehydrogenase	Mitochondria, cytosol
	Aldehyde oxidase	Cytosol
	Xanthine oxidase	Cytosol
	Monoamine oxidase	Mitochondria
	Diamine oxidase	Cytosol
	Prostaglandin H synthase	Microsomes
	Flavin-mono-oxygenases	Microsomes
	Cytochrome P450	Microsomes
Phase II		
Glucuronide conjugation		Microsomes
Sulfate conjugation		Cytosol
Glutathione conjugation		Cytosol, microsomes
Amino acid conjugation		Mitochondria, microsomes
Acylation		Mitochondria, cytosol
Methylation		Cytosol

Williams, 1971

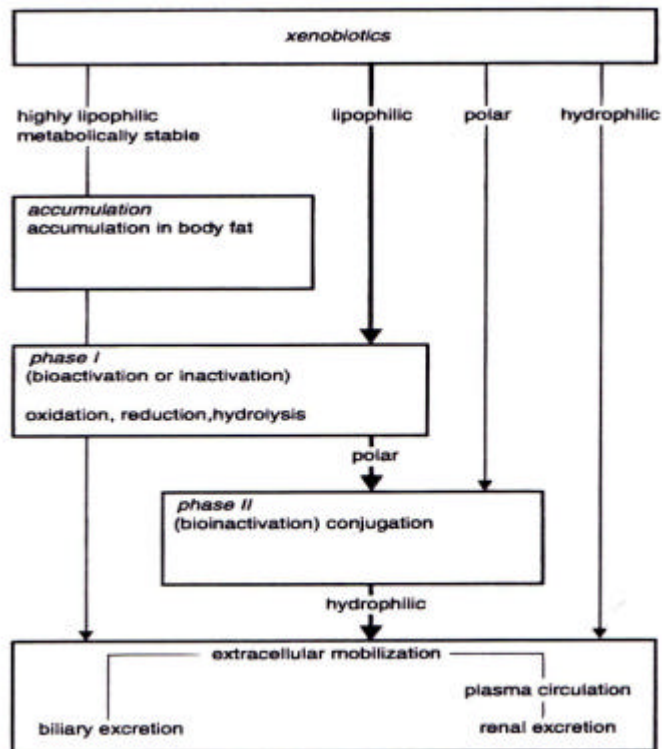


Fig .1 Biotransformation System

Raymond et al., 1996

## 二、細胞色素 P450 (Cytochrome P450)

細胞色素 P450 (Cytochrome P450, CYP450)是生物體內代謝外來物質包括藥物、食品添加物、致癌物及環境污染物最重要的酵素群之一( Guengerich et al., 1991)。此外 , CYP450 酵素系統也是代謝許多內生性物質如脂肪酸、類固醇及維生素等分子的重要酵素 (Ueng et al., 1995 )。CYP450 為含血基質鐵蛋白質,代謝外來物質效果是正反二面皆有 , 有時是將外來物質毒性降低,但有

時卻會活化外來物質，進而對人或動物產生致突變性、致癌性或致畸胎性，如：CYP 1A2 活化 arylamines；CYP 3A1 活化 polyhalogenated benzenes；CYP 2E1 活化 ethylene dibromide、urethane、trichloroethylene ( Guengerich, 1992 )，因此 CYP450 同時具有解毒及代謝活化的雙重角色。已知肝臟為動物體內解毒代謝的主要器官，在 phase I 階段進行氧化反應最主要的酵素為細胞色素 P450，它屬於單( monooxygenase ) ( Guengerich, 1991 )，與 NADPH cytochrome P450 reductase 以相鄰的方式鑲嵌在內質網膜上，又稱為混合功能氧化酶 ( mixed function oxidase )，具有氧化還原功能 ( Yang et al., 1998 )。細胞色素 P450 催化的基本反應是 monooxygenation，將氧原子併入受質中，再由 NADPH 處獲得電子，將受質形成具有氫氧基的產物及水的過程 ( Guengerich, 1991 )。

細胞色素 P450 是一種含鐵蛋白質，其血基鐵 ( heme iron ) 通常為三價鐵，當還原成二價鐵時，細胞色素 P450 會結合配位子 ( ligand ) 如氧或一氧化碳，此時含二價鐵的 CYP450 及一氧化碳複合物在波長 450 nm 附近有最大吸光值，因此以細胞色素 P450 來命名 ( Omura and Sato, 1964 )。

細胞色素 P450 在自然界中分佈廣泛，細菌、植物、哺乳動物及

人類都含有 CYP450 (Caroline, 2000)。細胞色素 P450 由多種不同 family (如: family 1、2、3、4) 及 subfamily (如: family 1A、2A、2B、2C、2D、2E、3A、4A) 所組成，雖然所作用的受質廣泛但仍具有相當的專一性(Gonzalez, 1988)。大部份在肝臟中藥物代謝由 CYP450 family 1, 2, 和 3 家族所負責(Wrighton et al., 1992)。許多研究顯示實驗動物 CYP450 可受多類化學物質之誘導或抑制。在嚙齒類動物中 CYP450 之誘導物可分成五大類 ❶ -naphthoflavone 誘導 CYP 1A ❷ phenobarbital 誘導 CYP 2B ❸ isoniazid、ethanol 誘導 CYP 2E ❹ dexamethasone 誘導 CYP 3A ❺ clofibric acid 誘導 CYP 4A ( Parkinson, 1996 )。在 CYP450 調控機轉研究中 CYP 1A1 具有重要毒理學意義。例如: CYP 1A1 是多環芳香碳氫化合物(polycyclic aromatic hydrocarbon, PAH)所主要誘導的 CYP450，同時它也是動物或人體中代謝 PAH 類致癌物的最重要代謝酵素( Gonzalez et al., 1994 )。CYP450 的種類和組織的分佈可由其被誘導性來觀察。例如，pregnenolone-16  $\beta$ -carbonitrile (PCN)能顯著誘導大鼠 CYP3A1，但是對人而言則無明顯誘導作用(Kocarek et al., 1995)。

CYP450 除了受到多類外在及內在因子活化外，許多生理及環境因素如疾病或暴露於環境汙染物如重金屬包括鉛、鎘、汞等，對動物及人類細胞色素 P450 也能產生抑制作用(Testa, 1990)。也有文獻指出

cimetidine、ketoconazole 等藥物及葡萄柚汁均可抑制動物及人類 CYP 3A 之酵素活性(Guengerich, 1995)。

由上述特性可知，細胞色素 P450 受不同生理及環境因子所調控，包括生物種類、性別、年齡、內分泌及飲食成份。此外，細胞色素 P450 所具有的基因多型性及因種族和組織差異所導致不同個體及種族對於毒物及藥物代謝產生重大差異(Lane and Chang, 1997)。

### 三、Phenobarbital (PB)與細胞色素 P450 2B

Phenobarbital (PB, phenylethylbarbituric acid, 苯乙基巴比妥酸)於醫療上可作為抗癲癇藥物(Morkunas et al., 1997)及鎮靜劑，藉著抑制興奮訊息傳遞至中樞神經系統，而達到鎮靜催眠的效果。許多化合物具有與 PB 相似的功能，通稱為 PB-like inducer，例如有機溶媒、殺蟲劑、含氯聯苯和藥物，這些化合物可以引起基因多顯的反應，包括肝臟腫大、以及作為嚙齒類動物的腫瘤促進劑(Peraino et al., 1975)、同時它可干擾細胞間 gap-junctional communication (Ruch et al., 1986)及誘導肝臟中藥物代謝酵素。

PB 已知可誘發很多基因的表現，對於肝臟有非常強之作用(Ramsden et al., 1993)。PB 可以誘發 CYP 1A、2A、2B、2C 及 3A 表現之外，它也可以誘發其他藥物代謝酵素，如 aldehyde dehydrogenase、epoxide hydrolase、NADPH cytochrome P450

reductase、UDP-glucuronyltransferase 及 glutathione S-transferase 等 (Waxman et al., 1992)。在肝臟中，CYP 2B 最容易被 PB 所誘發，尤其是 2B1(Waxman, 1992)。

已知 PB 的誘發作用必須透過活化基因之轉錄作用，但是真正的機制還不清楚，主要是因為在 *in vitro* 系統中缺乏穩定的誘發狀態。最近，一些學者以初代肝細胞培養的模式來再現 *in vivo* 系統中 PB 的誘發作用( Nemoto et al., 1995; Schuetz et al., 1988; Waxman et al., 1990; Honkakoski et al., 1996; Salonpaa et al., 1994 )。利用這個模式，證實 PB responsive enhancer (PBRE)位於大鼠 CYP 2B2 基因及小鼠 Cyp 2b10 基因末端-2.4 kbp 和-2.3 kbp 的區域(Trottier et al., 1995; Honkakoski et al., 1997)。CYP 2B PBREM 含有 NR1 及 NR2 兩個 nuclear receptor binding sites (Fig 2)(Honkakoski et al., 1998)。

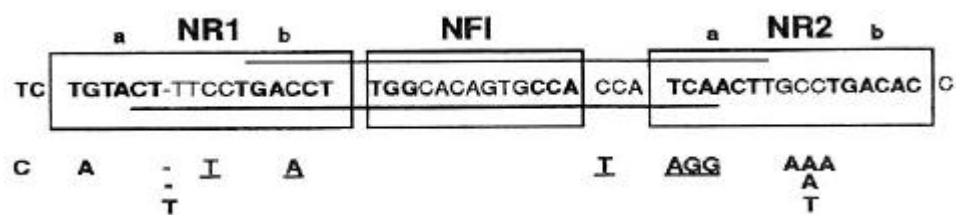


Fig. 2. PBREM

Honkakoski et al., 1998

有學者證實，經過 PB 處理後，大鼠肝細胞中的 constitutively active receptor (CAR)會進行 translocation，從細胞質轉移到細胞核。PB 可能可增加肝細胞核中 CAR 與 DNA 結合能力，因此增加PBREM

上之 NR1 與 CAR 結合，接著啟動 CYP 2B 基因的 transcription (Honkakoski et al., 1998)。最近有兩個 orphan nuclear receptors 被命名為 pregnane X receptor (PXR; NR1I2)及 constitutive androstane receptor (CAR; NR1I3)可以調控 PB 誘發肝臟 CYP 3A 及 CYP 2B 基因表現 (Honkakoski et al., 1998; Kliewer et al., 1998; Lehmann et al., 1998)。PXR; NR1I2 及 CAR; NR1I3 可以調控 PB 誘發 CYP 2B 基因之表現，在大鼠 Cyp 2b10 基因及人類 CYP 2B6 基因中也有類似構造 (Honkakoski et al., 1997)。由上述顯示調控 PB 誘發 CYP 2B 基因之表現可能與 CAR translocation 有關。

另外也有其他因子會影響 PB 誘發 CYP 2B 基因之表現 在 in vivo 研究中發現，glucocorticoid-progesterone antagonist RU486 對於 PB 誘發細胞色素 P450 的表現具有抑制效果 (Shaw et al., 1993)。在雞的肝細胞實驗中發現，2-aminopurine 是蛋白質激酶的抑 PB 誘發 CYP 2H1 基因的表現 (Dogra et al., 1996)。小鼠初代肝細胞培養模式中發現，長時間 PB 處理後(24 及 48 小時)顯著增加胞內鈣離子濃度，若以胞內鈣離子螯合劑處理則可抑制 PB 誘發 Cyp 2b9/10 基因的表現 (Marc et al., 2000)。有學者指出 PB 之誘發途徑也與發炎和感染的模式有關，在小鼠初代肝細胞培養模式中發現，以細菌的脂多醣體 (bacterial lipopolysaccharide; LPS)處理，會抑制 PB 誘發 CYP 2B1/2 基



因表現。在大鼠模式中也發現相似的結果(Li-Masters et al., 2001)。

#### 四、脂肪與細胞色素 P450 酵素活性

細胞色素 P450 family 4 主要負責脂肪酸及前列腺素之代謝，(Bains et al., 1985)。許多動物實驗發現，日糧中油脂的種類及含量，會影響存在或缺乏誘導物下肝中細胞色素 P450 酵素之活性(Yoo et al., 1992)。Chen 等人(1997)亦提出，PB 處理會增加肝中細胞色素 P450 總含量及使 NADPH cytochrome P450 reductase 活性增加。Chen 等人(1997)發現，日糧中油脂的種類及含量，會影響大鼠肝臟磷脂質脂肪酸組成。然而，此實驗中PB 處理顯著降低大鼠肝臟磷脂質 AA 及 DHA 的含量。Yoo 等人(1991)提出，日糧中油脂的含量，會影響肝中細胞色素 P450 酵素系統。Chen 等人(1997)亦發現，若於日糧中額外添加 20 % 油脂，肝中細胞色素 P450 總含量及 NADPH cytochrome P450 reductase 活性會明顯增加。Chen 等人(1997)亦指出，肝中 CYP450 2B1 蛋白質量明顯與日糧中油脂的種類及含量有關。此實驗發現大鼠餵食魚油組，肝中 CYP450 2B1 蛋白質量明顯高於餵食玉米油組。許多研究發現，飲食中脂肪酸可以利用直接或間接的方式調控經由受器傳達的訊號路徑，這些訊號路徑也會影響基因表現(Hwang et al., 1999)。Capdevilla 等人(1990)提出，細胞色素 P450 調控脂肪酸代謝可能透過 PUFA 代謝路徑來活化訊息傳遞影響基因之轉錄。

總結上述之文獻，證實日糧中油脂的種類及含量確實會影響細胞色素 P450 酵素活性，但必須要經由 PB 才會誘發 CYP 2B1 之表現(Ishii et al., 1986)。學者們也認為脂肪酸可能是透過直接或間接的途徑來調控基因的表現，而脂肪酸在分子和細胞之間的反應機制為何仍須進一步研究(Hwang et al., 1999)。

### 五、n-3 和 n-6 脂肪酸之生理作用

由於身體無法自行合成 n-3 和 n-6 多元不飽和脂肪酸如次亞麻油酸(ALA; 18:3 n-3)、亞麻油酸(LA; 18:2 n-6)，此兩種脂肪酸被稱為必需脂肪酸(Fig 3)(Roberts, 1990)。

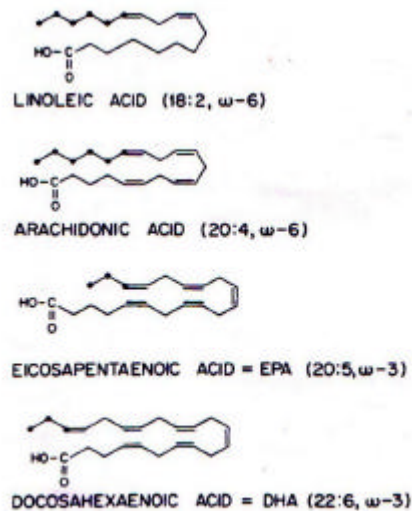


Fig. 3. Examples of metabolically important, naturally occurring polyunsaturated fatty acids Roberts, 1990

它們可經由 <sup>5</sup> 去飽和 <sup>6</sup> 去飽和 與 鏈(elongation) 合成二十碳多元不飽和脂肪酸，如花生四烯酸(AA; 20:4 n-6)、二十碳

五烯酸(EPA ; 20:5 n-3)及二十二碳六烯酸(DHA ; 22:6 n-3)(Fig 4)(Schlemmer et al., 1999) n-3 PUFA 最後轉變為 DHA (22:6, n-3)儲存在各種組織中 , 如眼、腦神經、細胞壁等 , 具有抗前列腺素 (prostaglandins)和白烯三素(leukotriene)的作用。n-6 PUFA 最後轉變成 AA (20:4 n-6)並形成各種前列腺素(PGG<sub>2</sub>、PGH<sub>2</sub>、PGE<sub>2</sub>、PGF<sub>2</sub>)和白烯三素(LTA<sub>4</sub>、LTB<sub>4</sub>、LTC<sub>4</sub>、LTD<sub>4</sub>、LTE<sub>4</sub>)等抑制免疫反應的物質 , 其中以 PGE<sub>2</sub> 和 LTB<sub>4</sub> 在抑制免疫反應上最具關鍵性(James et al., 2000)。飲食中 n-3 和 n-6 PUFA 主要影響二十碳烯酸 (eicosanoids)之代謝、維持生物體正常生長和發展、在營養及代謝上扮演重要角色、構成細胞膜上磷脂質的成份、影響基因表現和細胞間的訊息傳遞 (Simopoulos, 2000)。

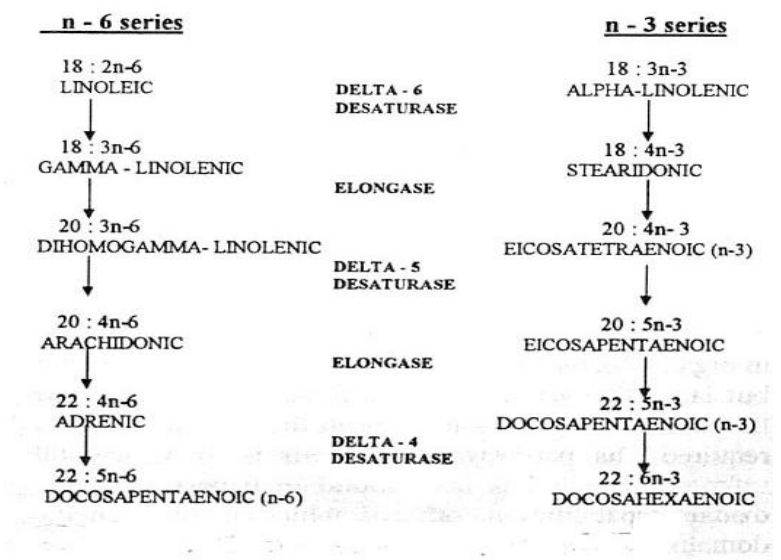


Fig 4. Pathways of metabolism for both n-6 and n-3 EFA  
Schlemmer et al., 1999

n-3 和 n-6 PUFA 在生物體內具有多種生理功能。腫瘤研究發現，n-6 PUFA 會促進腫瘤細胞增生；反之，n-3 PUFA 會抑制腫瘤細胞增生 (Tisdale, 1993)。對於細胞功能的影響，EPA (20:5, n-3)及 DHA (22:6, n-3)為一超長鏈多元不飽和脂肪酸，鍵結於細胞膜磷脂質上，可增加細胞膜流動性(Castuma et al., 1983)。但因具有較多的雙鍵容易受到自由基之攻擊而產生脂肪過氧化反應造成細胞傷害(Hart et al., 1991)。在動物及細胞培養模式中發現 n-3 PUFA 具有降低血脂肪、抗血栓及抗發炎的效果(Weber and Leaf, 1991)。預防心血管疾病方面，大鼠和人體實驗發現攝取富含 EPA (20:5, n-3)及 DHA (22:6, n-3)的魚油，可以顯著降低血脂(Harris, 1996)，因此可降低冠狀心臟疾病的死亡率(Dyerberg et al., 1982)。動物以及人體研究發現，攝取 EPA 及 DHA 會降低 PGE<sub>2</sub> 的合成、前列凝素 A<sub>2</sub> (thromboxane A<sub>2</sub>)的濃度、白烯三素 B<sub>4</sub> (leukotriene B<sub>4</sub>)的生成、增加前列凝素 B<sub>3</sub> (thromboxane B<sub>3</sub>)的濃度、前列環素(prostacyclin I<sub>3</sub>)的濃度、白烯三素 B<sub>5</sub> (leukotriene B<sub>5</sub>)的濃度(Lewis et al., 1986; Weber et al., 1986)。若飲食中增加 n-6 PUFA 攝取如 AA (20:4, n-6)、LA (18:2, n-6)，則會促進二十碳烯酸(eicosanoids)合成而形成具有多種生物活性的物質，如前列腺素(prostaglandin)、白烯三素(leukotriene)、前列凝素(thromboxane)、帶有氫氧基的脂肪酸(hydroxy fatty acids)和 lipoxin，這些物質對血液會

造成凝集和黏稠、而且造成血管緊縮、減少血流時間進而導致動脈硬化的發生；及產生過敏和發炎反應(Simopoulos, 2000)。對於基因表現的研究發現，AA (20:4, n-6)透過內生性之代謝轉變成 PGE<sub>2</sub>，會降低小鼠 3T3 纖維母細胞中 c-fos 及 Egr-1 基因表現。相反的，EPA (20:5, n-3) 和 DHA (22:6, n-3)會顯著降低外生性 AA 代謝轉變成 PGE<sub>2</sub>，同時它們會增加小鼠 3T3 纖維母細胞中 c-fos 及 Egr-1 基因表現 (Sellmayer, 1997)。對於免疫功能方面，在不同的 in vitro 細胞培養模式中，發現 n-3 PUFA 可以抑制細胞激素(cytokines)的產生，細胞激素濃度的下降具有抗發炎的特性(Endres et al., 1995)。

## 六、n-3、n-6 脂肪酸與 PGE<sub>2</sub> 合成之關係

由於前列腺素在生理功能上扮演多樣而且重要的角色，所以對能影響其濃度的 n-3、n-6 脂肪酸在生理上的角色也不容忽視。腫瘤研究發現，飲食中富含 EPA (20:5, n-3)及 DHA (22:6, n-3)可抑制大鼠乳房腫瘤細胞的生長，可能原因與 EPA (20:5, n-3)是合成前列腺素系列 3 的前驅物質有關(Karmali, 1987)。Sasaki 等人(1998)即指出，前列腺素系列 2 具有促進腫瘤生長的作用，而前列腺素系列 3 則可抑制腫瘤生長。由於 n-3 PUFA 和 n-6 PUFA 共同競爭調控前列腺素合成的重要酵素--環氧 (Cyclooxygenase)，導致 n-6 PUFA 轉變為前列腺素系列 2 的量減少(James et al., 2000)，因此在腫瘤生長過程中 n-3 PUFA

可以抑制腫瘤生長。對於免疫功能方面，發現大鼠餵食 EPA + DHA 飲食可以降低脾臟白血球 PGE<sub>2</sub> 的產生，在以前的研究發現 PGE<sub>2</sub> 具有抑制免疫反應的作用(Meydani et al., 1990)。因此根據 EPA + DHA 飲食可增強大鼠免疫反應和疾病的抵抗力(Peterson et al., 1998)。在 3T3L1 脂肪細胞培養模式中發現，AA (20:4, n-6)經由環氧(cyclooxygenase)的作用，所產生的 PGE<sub>2</sub> 可抑制肝臟脂質相關基因的表現(Mater et al., 1999)。因此，n-6 PUFA 具有抑制肝臟脂質相關基因的轉錄作用，進而降低肝臟脂質合成作用(Jump et al., 1994)。也有學者提出，在 in vivo 研究中給予 indomethacin 並不會阻斷 n-6 PUFA 抑制脂肪酸合成(Lick et al., 1977)。因此推測在肝實質細胞中 n-6 PUFA 抑制脂質基因表現，並不經由 cyclooxygenase-dependent pathway。此外，飲食中 n-3 PUFA 和 n-6 PUFA 與膠原的產生有直接相關性，在 MCL cell (medial collateral ligament)培養模式中發現，添加 LA (18:2, n-6)會降低鳥類軟骨細胞膠原之合成；相反的，添加 EPA (20:5, n-3)會干擾 PGE<sub>2</sub> 的產生而增加鳥類軟骨細胞膠原之合成(Watkins et al., 1996)。

## 七、前列腺素 E<sub>2</sub> (Prostaglandin E<sub>2</sub> , PGE<sub>2</sub>)

### 【生理作用】

由亞麻油酸衍生而來花生四烯酸，是好幾類訊息分子的主要前

驅物，前列腺素(prostaglandin)為其中之一；PGE<sub>2</sub>屬於前列腺素中的一種。PGE<sub>2</sub>是由花生四烯酸衍生而來，合成途徑是透過位於細胞膜上磷脂質酶(phospholipase A<sub>2</sub>)的作用，將細胞膜磷脂質 C2 上的花生四烯酸切下(cyclooxygenase, COX)途徑生成 PGG<sub>2</sub>，再由 peroxidase 作用生成 PGH<sub>2</sub>；PGH<sub>2</sub>很快地轉變成 PGD<sub>2</sub>、PGF<sub>2</sub>、PGI<sub>2</sub>等前列腺素，PGE<sub>2</sub>是透過 PGE<sub>2</sub>合成作用而列腺素及其他二十碳烯酸的生命期短，可作為區域性的激素。

PGE<sub>2</sub> 已知可以引起血管擴張的發炎反應。研究證實，大鼠纖維母細胞若以 IL-1、TNF- 處理後，會誘發OX-2)的活性，進而增加 PGE<sub>2</sub>的合成(Hughes et al., 1999)。因此，細胞激素與 PGE<sub>2</sub>在發炎反應中扮演著重要角色，而且細胞激素也是誘導 PGE<sub>2</sub>產生的前發炎性(proinflammatory)物質。PGE<sub>2</sub>對於腫瘤的影響，文獻指出 PGE<sub>2</sub>會抑制巨噬細胞分泌 TNF、IL-2 及 NO，具有降低巨噬細胞毒殺腫瘤的能力，若以 indomethacin 抑制 PGE<sub>2</sub>的合成，則可增加巨噬細胞活性，具有抑制腫瘤細胞生長的作用(Alleva et al., 1995)。

此外，PGE<sub>2</sub>尚有其他生理功能，它可影響胃黏液分泌(Suetsugu et al., 2000)；也可以調節腎臟血液流動和鈉的排泄(Chiolo et al., 2000)。文獻指出，腎臟疾病的病人 PGE<sub>2</sub>的合成會增加(Rahman et al., 1987)。PGE<sub>2</sub>對肝臟的影響是可以調節部份肝切除後再生的能力、降

低經由四氯化碳所造成的細胞傷害及可以有效治療猛爆性肝炎 (Sinclair et al., 1989)。PGE<sub>2</sub> 在肺臟中具有擴張支氣管和血管的作用 (Barzanti et al., 1999)。已知細胞內鈣離子濃度增加時 PGE<sub>2</sub> 會誘導子宮的收縮(Kotani et al., 2000)。PGE<sub>2</sub> 也參與骨骼生成，文獻指出低濃度 PGE<sub>2</sub> 會刺激骨骼形成；此機制可能是 PGE<sub>2</sub> 會增加 insulin-like growth factor 產生，此荷爾蒙主要刺激骨骼、軟骨和肌肉的生長。若高濃度 PGE<sub>2</sub> 會抑制此效應，會降低骨骼生成及增加骨骼再吸收作用 (Baylink et al., 1993)。

## 八、PGE<sub>2</sub> 與 cAMP 合成之關係

PGE<sub>2</sub> 在很多組織中具有廣泛的生理作用；文獻指出，PGE<sub>2</sub> 位於細胞膜上的受器皆與 G-protein 結合，分別是 EP1、EP2、EP3、EP4 四種 subtypes；但所調控的訊息傳遞途徑卻大不相同。活化的 EP1 使胞內鈣離子濃度增加(Watabe et al., 1993)；EP2 及 EP4 可透過 Gs-protein 活化 adenylyl cyclase，使胞內 cAMP 濃度增加(Nishigaki et al., 1995；Remier et al., 1992)；EP3 主要經由 Gi-protein 抑制 adenylyl cyclase，降低胞內 cAMP 濃度(Sugimoto et al., 1992)(Fig 5)。

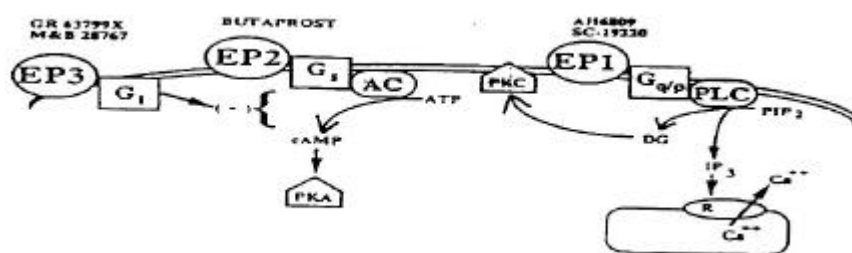


Fig 5 Functions of PGE receptors Sugimoto et al., 1992



PGE receptors 分別存在不同組織中，EP1 主要在肌肉組織；EP2 主要在脾臟、肺臟及睪丸；EP3 主要在肝臟、腎臟；EP4 所有組織都存在(Boie et al., 1997)。許多研究指出，PGE<sub>2</sub> 是透過細胞中 cAMP 的訊息傳遞路徑來調控多種生理功能。在動物實驗中發現，PGE<sub>2</sub> 可以活化大鼠腹膜巨噬細胞上的 EP2 及 EP4 進而透過 Gs-protein 活化 adenylyl cyclase，增加胞內 cAMP 濃度和 c-fos mRNA 表現(Daming et al., 2000)。有文獻指出，狗的骨骼生長與 PGE<sub>2</sub> 合成代謝作用有關；PGE<sub>2</sub> 結合 EP2 及 EP4 可透過 Gs-protein 活化 adenylyl cyclase，增加胞內 cAMP 濃度(Raisz, 1995)。此外也有學者指出，PGE<sub>2</sub> 與細胞膜上的 EP2 及 EP4 結合可透過 Gs-protein 刺激大鼠腎上腺的帶狀腎小球細胞中 adenylyl cyclase 活性，進而增加胞內 cAMP 濃度(Tanaka et al., 2000)。有文獻指出，大鼠給予 rebamipide，一種抗胃潰瘍藥物，在大鼠 RGM1 cell 中 PGE<sub>2</sub> 可透過細胞膜上 EP4 之表現，增加胞內 cAMP 含量，進而增加胃黏液的分泌(Suetsugu et al., 2000)。對於免疫功能方面，PGE<sub>2</sub> 可以活化血液單核球中 adenylyl cyclase 活性，增加胞內 cAMP 含量，進而降低 TNF- $\alpha$  的分泌(Seldon et al., 1995)。PGE<sub>2</sub> 可以增加人類呼吸道平滑肌細胞(HASM cell)中細胞激素的產生，增加胞內 cAMP 含量，另外它也降低顆粒性白血球巨噬細胞菌落刺激因子(GM-CSF)的產生(Lazzeri et al., 2001)。由以上文獻回顧可知，cAMP

對於 PGE<sub>2</sub> 的生理功能扮演重要的角色。

## 九、Cyclic AMP 與 Phenobarbital 誘發細胞色素 P450 2B 之表現

Cyclic AMP (cAMP) 是一種由 ATP 所衍生而來的核 酸 (Fig 6) (Lodish et al., 2000)。許多調控細胞生理功能之外來物質或內生性荷爾蒙無法進入細胞內，必須與細胞膜表面的受器結合，進而活化腺酸環化 (adenylyl cyclase) 合成 cAMP，再由 cAMP 於細胞內扮演荷爾蒙的二級訊息 (second messenger) 角色。cAMP 在真核細胞內的作用大部分都經由活化 protein kinase A (PKA) 或 cAMP-dependent protein kinase (cAPK)。PKA 是 專 一 性 的 激 酶，能對 serine 或 threonine 進行磷酸化而改變蛋白質的活性，進而調控所要表達的細胞生理功能 (魏, 1997)。

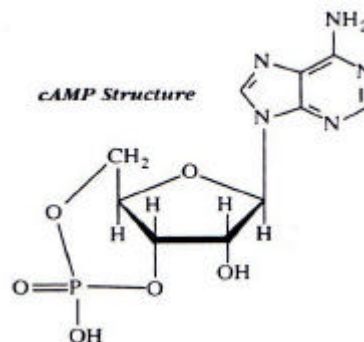


Fig. 6 cAMP Structure Lodish et al., 2000

許多荷爾蒙是經由活化腺 酸 環 (adenylyl cyclase) 而將 ATP 轉變為 cAMP，其中 G-蛋白質參與荷爾蒙-受體複合物與腺 酸 環 的 偶 合 作 用，例如升糖素、腎上腺素

及促腎上腺皮質素都是以這樣的方式作用(陳, 1999)。

許多文獻指出, PB 調控 CYP 2B1 基因表現機制尚不十分清楚, 有研究指出 cAMP 在 PB 誘發 CYP 2B1 基因表現中扮演負向調控的角色(Sidhu, 1995)。在初代肝細胞培養模式中發現, 以 cAMP 相似物 8-bromo-cAMP 及 adenylyl cyclase 活化劑 forskolin、glucagon 處理細胞時, 明顯抑制 PB 誘發 CYP 2B1 及 CYP 2B2 基因表現; 此外 cAMP 也會抑制 PB 誘發 CYP 3A1 mRNA 表現(Sidhu et al., 1995)。在小鼠初代肝細胞研究中也發現以 cAMP-dependent protein kinase (PKA) 活化劑處理後, 會抑制 PB 誘發 Cyp 2b9/10 基因的表現; 而若以 PKA 的抑制劑處理後, 會增加 PB 誘發 Cyp 2b9/10 基因的表現 (Marc et al., 2000)。即使細胞內 cAMP 濃度很高, 對於  $\beta$ -naphthoflavone 誘發 CYP 1A1, CYP 2A1 及 dexamethasone 誘發 CYP 3A1 基因表現都不會有影響(Sidhu et al., 1995)。因此得知, cAMP 對 CYP 450 表現的調控機制是有選擇性的。細胞研究發現胞內 cAMP 的增加是透過活化腺酸環化 (adenylyl cyclase), 抑制磷酸(phosphodiesterase)或添加 cyclic nucleotides 會增加 PB 誘發 CYP 450 的作用(Grinstein, 1989)。表示 PB 本身並不會改變肝細胞中 cAMP 濃度, 唯有透過會啟動細胞中 cAMP 之訊息傳遞路徑的因子才會影響 PB 誘發 CYP 450 的作用 (Beck, 1999)。

## 實驗動機

由上述文獻得知，日糧中油脂的種類及含量確實會影響動物細胞色素 P450 酵素活性，本實驗以初代肝細胞培養模式來探討油脂中何種脂肪酸成分是主要影響 PB 誘發 CYP 2B1 之因子。

# 材料及方法

## 一、實驗材料

### (1) 實驗動物

6-8 週齡雄性 Sprague-Dawley 大白鼠，由國家科學委員會  
實驗動物繁殖暨研究中心購進。

### (2) 化學試劑

一般分析用藥：

#### 1. 購自美國 Sigma Chemical Company

Bovine serum albumin (BSA)

Calcium Chloride ( $\text{CaCl}_2$ )

Collagen

Collagenase

3,3' -diaminobenzidine (DAB)

Dexamethasone

Earle' s balanced salt solution (EBSS)

Ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA)

Ethylene glycerol tetraacetic acid (EGTA)

Glucose

N- ( 2-Hydroxyethyl ) piperazine-N' - ( 2-ethanesulfonic acid )

HEPES

Potassium Chloride (KCl)

Potassium Hydrogen phosphate ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )

Potassium Dihydrogen phosphate ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )

Magnesium alcohol ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )

3-(N-Morpholino)propanesulfonic acid (MOPS)

Sodium carbonate ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )

Sodium bicarbonate ( $\text{NaHCO}_3$ )

Sodium phosphate ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )

Sodium phosphate ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ )

Na-K-tartrate

Phenobarbital

Phenol red

Ponceau S solution

Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)

Sodium acetate

-Tocopheryl succinate

Trizma base (Tris)

Triton X-100

Linoleic acid (LA) sodium salt

Arachidonic acid (AA) sodium salt

Cis-5,8,11,14,17-Eicosapentaenoic acid (EPA) sodium salt

Cis-4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoic acid (DHA) sodium salt

Indomethacin

## 2. 購自德國 Merck Chemistry Company

Chloroform

Formaldehyde

Formamide

Hydrochloric acid (HCl)

Hexane

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Isopropanol

Isobutanol

Magnesium chloride hexahydrate (MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O)

Sodium chloride (NaCl)

Sodium hydroxide (NaOH)

Trichloroacetic acid (TCA)

3. 購自日本

Copper sulfate (CuSO<sub>4</sub>) 島久藥品株式會社

Ethanol ( 99.5 % ) 昭和化學株式會社

Folin-cicalteu reagent; Phenol reagent 和光純藥工業株式會社

4. 購自美國 BioRad Laboratories

30 % Acrylamide/0.8 % N,N methylene-bis-acrylamide 溶液

Bromophenol blue

Glycine

5. 購自美國 Pharmacia Biotech

Ammonium persulfate

Percoll™

6. 購自美國 Millipore

Polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane

7. 購自英國 Amersham International Comoany

[  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$  ]dCTP

8. 購自美國 Gibco Laboratory

dNTP (dTTP, dATP, dGTP)

Penicillin/streptomycin

TRIZOL reagent

Trypan blue stain

Williams' E medium

9. 購自 Collaborative Biomedical Products

ITS+<sup>TM</sup> Premix

Matrigel

10. 購自 Cayman

PGE<sub>2</sub> enzyme immunoassay Kit

11. 購自美國 GENTEST

Anti-P450 2B1/2 Polyclonal antibody



## 二、實驗方法

### (1) 肝細胞分離(Hepatocytes isolation)

肝細胞分離利用二階段灌流方式，老鼠先以腹腔注射 sodium pentobarbital (80 mg/kg body weight)麻醉，剪開腹腔，利用頭皮針經肝門脈灌洗，第一階段先 calcium-free Earle's balanced salt solution (EBSS)(pH7.4)，內含 0.75 mM EGTA、100 units/ml penicillin 和 1 mg/ml streptomycin 將肝中血液灌洗出(25 ml/min)。灌流持續 6 分鐘後，再以 200 ml EBSS (pH7.4)內含 100 units/ml penicillin 和 1 mg/ml streptomycin、1.8 mM CaCl<sub>2</sub> 及 50 mg 膠原蛋白酶 (collagenase)，進行第二次灌洗(10 ml/min)。約經 10 分鐘消化後，肝臟逐漸變軟且失去彈性，細胞間隔也放大，外觀顏色逐漸變淡，此時即可將肝臟剪下並移出體外，放置於過濾的尼龍網上 (200 $\mu$ m, Tetko)，輕柔攪拌於含 10 mM HEPES、2 mM L-glutamine、100 units/ml penicillin、1 mg/ml streptomycin、1  $\mu$ M dexamethasone 及 ITS<sup>+</sup>(含 6.25  $\mu$ g/ml insulin、6.25  $\mu$ g/ml transferrin、6.25 ng/ml selenious acid、1.25 mg/ml BSA 及 5.35  $\mu$ g/ml linoleic acid)之 Williams' E medium 中(pH7.4)，將肝細胞磨出並進行低速離心(50 xg, 2 min)。分離後之肝細胞懸浮液以上述 Williams' E medium(不含 ITS<sup>+</sup>)經二次低速離心 (50 xg, 2 min)，將肝細胞洗淨，然後於第二次離心後，為了有效分

離健康之肝實質細胞(hepatic parenchymal cell)與受傷細胞、非肝實質細胞或死細胞，於細胞懸浮液中加入等量 percoll 溶液(percoll : 10x Hank' s buffer = 9 : 1)進行一次密度梯度離心(350 xg , 10 min)。最後再使用 Williams' E medium(不含 ITS<sup>+</sup>)經二次低速離心(225 xg , 3 min)。以除去殘留 percoll 溶液。離心後所得的細胞利用與磨細胞相同之 Williams' E medium (含 ITS<sup>+</sup>)為基本成分再將細胞懸浮於其中。在分植到培養皿前，先計算細胞數及細胞存活率，方法如下：取 0.1 ml 細胞懸浮液加入 1.5 ml 細胞培養液及 0.4 ml trypan blue (0.4 % )，輕輕震盪混合後，以血球計數板來計算總細胞數及活細胞數，即可求出細胞存活率。最後將細胞懸浮液密度調為每一毫升含 0.6 百萬個細胞，並分別將 5 ml 細胞懸浮液加入直徑 6 公分事先經膠原蛋白(collagen , type )處理的培養皿中，然後置於 37 含 5 % CO<sub>2</sub> 的培養箱中。培養 3 小時後，更換培養液此時(dexamethasone 濃度為 0.1 μM)，再經 1 小時後加入 233 μl Matrigel (5 mg/ml)於每一個培養皿中(最終濃度為 233 μg/ml )，之後每天更換培養液，並依實驗設計作不同處理。

10 X Hank's buffer (pH 7.4) 配方如下:

---

1 L	
NaCl	80g
KCl	4g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.9g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.6g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1g
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	1g
Phenol red	0.1g
Glucose	10g
NaHCO <sub>3</sub> (最後加)	3.5g

---

## (2)細胞處理

N-3 和 n-6 脂肪酸對 PB 誘發 cytochrome P450 2B1 表現之影響

細胞培養至 48 小時，於更換培養液的同時加入 2.5  $\mu$ l 10 mM，-tocopheryl succinate 最終濃度為 10  $\mu$ M，其中 -tocopheryl succinate 以 ethanol 作為載體，ethanol 在培養液中最終濃度為 0.05 %。經過預培養 30 分鐘後分別加入 36.1  $\mu$ l 6.93 mM，LA (18:2, n-6)、AA (20:4, n-6)、EPA (20:5, n-3)、DHA (22:6, n-3)脂肪酸最終濃度為 50  $\mu$ M。四種脂肪酸與 bovine serum albumin (15 % BSA，不含脂肪酸)以 1:4(莫耳比)複合，其中脂肪酸以 ethanol 作為載體，ethanol 在培養液中最終濃度為 0.83 %。經過 4 小時預培養後，於培養液中添加 10  $\mu$ l 50 mM，

PB 最終濃度為 0.1 mM。再經 20 小時培養後，收集培養液，分析 PGE<sub>2</sub> 濃度，作為細胞合成 PGE<sub>2</sub> 能力之指標；同時收取細胞，分析細胞中脂肪酸含量；另外製備肝細胞微小體及抽取 RNA，分別以 Western blotting 及 Northern blotting 測定 P450 2B1 蛋白質及其 mRNA 表現

Indomethacin 對 n-3、n-6 脂肪酸影響 PB 誘發 cytochrome P450 2B1 表現之影響

細胞培養至 48 小時，於更換培養液時加入 5  $\mu$ l 20 mM 之 indomethacin 最終濃度為 20  $\mu$ M，indomethacin 以 ethanol 作為載體，ethanol 在培養液中最終濃度為 0.1 %。經過預培養 30 分鐘後分別加入 36.1  $\mu$ l;6.93 mM，LA (18:2, n-6)、AA (20:4, n-6)、EPA (20:5, n-3)、DHA (22:6, n-3) 脂肪酸最終濃度為 50  $\mu$ M。四種脂肪酸與 bovine serum albumin (15 % BSA，不含脂肪酸) 以 1:4(莫耳比)複合，其中脂肪酸以 ethanol 作為載體，ethanol 在培養液中最終濃度為 0.83 %。經過 4 小時預培養後，於培養液中添加 10  $\mu$ l 50 mM，PB 最終濃度為 0.1 mM。再經 20 小時培養後，收集培養液，分析 PGE<sub>2</sub> 濃度，作為細胞合成 PGE<sub>2</sub> 能力之指標；同時收取細胞，分析細胞中脂肪酸含量；另外製備肝細胞微小體及抽取抽取 RNA，分別以 Western blotting 及 Northern blotting 測定 P450 2B1 蛋白質及其 mRNA 表現。

### (3)細胞存活率(cell viability)測定

#### 1. 樣品製備:

取細胞外液 600  $\mu\text{l}$  , 此部份為分析滲漏至胞外的 lactate dehydrogenase (LDH)活性; 至於胞內 LDH 活性, 則先以 PBS (4 ) 清洗細胞二次, 加入 1 ml 0.01 M 磷酸鉀緩衝液(pH 7.4), 以細胞刮取器將細胞刮下, 利用超音波震碎機於冰浴下充分均質, 在 4 下以 6,500  $\times\text{g}$  離心 10 分鐘, 取上清液 20  $\mu\text{l}$  , 此部份代表胞內 LDH 活性, 此部份必須於當天完成分析。

#### 2.樣品分析:

##### (1) 反應混合液

10 mM Kreb-Henseleit buffer (pH 7.4)中含 0.2 mM NADH 及 1.36 mM sodium pyruvate。

Kreb-Henseleit buffer 配方如下:

---

	(g/L)
NaCl	6.9
KCl	0.36
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.13
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.295
CaCl <sub>2</sub>	0.332
NaHCO <sub>3</sub>	2.0
BSA	20.0

---

## (2)分析步驟:

取 900  $\mu\text{l}$  反應混合液(10 mM Kreb-Henseleit buffer 中含 0.2 mM NADH 及 1.36 mM sodium pyruvate), 依序加入 100  $\mu\text{l}$  細胞外液或 15  $\mu\text{l}$  細胞均質液, 最後加入 85  $\mu\text{l}$  20 mM 磷酸鉀緩衝液使反應總體積為 1000  $\mu\text{l}$ , 放入分光光譜儀中(U2000, Hitachi, Japan), 於 25  $^{\circ}\text{C}$  下以波長 340 nm 掃描 3 分鐘, 測量 NADH 在 3 分鐘內減少的速率。細胞存活率最後以胞外 LDH 活性占總 LDH 活性百分比來表示。LDH leakage=胞外 LDH 活性/(胞外 + 胞內) LDH 活性  $\times$  100 %。LDH 活性以比活性表示: nmol/min/plate。

## (4)細胞中脂肪酸組成分析

### 實驗步驟:

取 300  $\mu\text{l}$  的細胞均質液至玻璃試管中, 加入 2 ml 脂肪萃取液 (methanol:benzene=4:1), 振盪混合, 再緩慢加入 200  $\mu\text{l}$  acetyl chloride, 振盪混合後在 100  $^{\circ}\text{C}$  下水浴 1 小時, 之後取出冷卻 10 分鐘, 再加入 5 ml 6 %  $\text{K}_2\text{CO}_3$  振盪混合, 在室溫下以 1100  $\times g$  離心 10 分鐘, 取出上層液以氮氣吹乾, 再加入 150  $\mu\text{l}$  hexane 充分混合, 取 3  $\mu\text{l}$  注射到 GC 系統中分析各種脂肪酸含量。結果依照樣品在 GC 系統分析中所出現的波峰再與脂肪酸標準品滯留時間作比較, 確認樣品中每個脂肪酸。每個脂肪酸百分比是以個別脂肪酸佔所有脂肪酸之總面積比來計算。

## 【GC 系統】

Gas chromatograph G3000 (Hitachi, Tokyo, Japan), D-2500 integrator (Tokyo, Japan), GC column: SP-2330 fused silica capillary column 30 m×0.25 mm ID, 0.20 μm film thickness (Supelco, Bellefonte, PA), Carrier gas: Nitrogen, 管柱溫度為 150 持續 8 min 後再以 2 /min 速度上升到 190 , Injector and detector (FID): 220 。

## (5) 蛋白質表現分析

### A. 蛋白質濃度測定(Lowry et al., 1951)

將微小體懸浮液在冰浴中以超音波震碎機充份均質，取 20 μl 懸浮液置於 1.5 ml 微量離心管中，加入等量 10 % trichloroacetic acid (TCA)，靜置 30 分鐘使蛋白質沉澱，接著在 4 下以 8,600 xg 離心 10 分鐘，移除上清液加入 400 μl 1N NaOH 混合均勻，靜置 30 分鐘使蛋白質完全水解。取 100 μl 蛋白質水解液及不同濃度標準品置於 1.5 ml 微量離心管中，依序加入 200 μl 二次水及 100 μl (反應液 8:1:1, v/v/v 25 % Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>: 2 % Na-K-tartrate: 1 % CuSO<sub>4</sub>)，混合均勻置於室溫下靜置 10 分鐘，使 amino acid 上的-COOH 與 Cu<sup>2+</sup>作用。接著加入 1 ml Folin reagent (phenol reagent: ddH<sub>2</sub>O=1:19.5)混合均勻，置於 37 水浴反應 20 分鐘，呈色後取出置於室溫下冷卻 10 分鐘，利用分光光譜儀以波長 660 nm 測出標準品之吸光值作出標準曲線，並利用標準曲線

測出樣品之蛋白質濃度。

標準曲線的樣品是以 0.5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  1N NaOH-BSA 配成不同濃度之標準品，濃度及配法如下：

BSA ( $\mu\text{g}$ )	0	8	16	24	32
0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ BSA ( $\mu\text{l}$ )	0	16	32	48	64
1N NaOH ( $\mu\text{l}$ )	100	84	68	52	36

#### B. 電泳分析(SDS-PAGE) (Laemmli, 1970)

微小體蛋白質濃度測定後，先將微小體蛋白質濃度稀釋 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ，加入等體積之蛋白質樣品緩衝液，置於 95 下煮 5 分鐘，冷卻後將等量蛋白質樣品分別注入各個樣品凹形槽中，利用 10 % SDS-polyacetylamide gels 以 160 伏特電壓將不同蛋白質分離。

#### C. 西方墨點法( Western blotting ) (Tombine et al., 1979)

電泳完成後先將 stacking gel 的部分切除，把剩下的 separating gel 浸泡於 transfer buffer ( 25 mM Tris-HCl, pH 8.4, 含 192 mM glycine 及 20 % methanol ) 15 分鐘，同時將 PVDF 轉印膜先以 99 % ethanol 浸泡 2 分鐘再與膠片一起浸泡於 transfer buffer 中。浸泡後依序將海綿、濾紙、膠片、PVDF 轉印膜、濾紙、海綿放置於三明治式塑膠板中，接著放入轉印槽，以 100 伏特電壓於冰浴下進行轉印，1 小時 30 分鐘後取出 PVDF 轉印膜，先以 buffer A ( 25 mM Tris-HCl, 含 150 mM NaCl,



0.3 % Tween-20, pH 7.4 )沖洗 3 次 , 每次 5 分鐘 , 隨後放置於以 buffer B ( 25 mM Tris-HCl, 含 150 mM NaCl, pH 7.4 )配製成的 blocking solution 中( 20 ml buffer B 加入 1 g 脫脂奶粉)中 , 置於 4 °C 下隔夜或在 37 °C 水浴 30 分鐘後即可進行免疫染色。

#### D. 免疫染色

將 PVDF 轉印膜由 blocking solution 中取出 , 以 buffer A 沖洗 3 次 , 每次 5 分鐘 ; 接著置於含 P450 2B1 一級抗體的 buffer B 中 (antibody: buffer B=1:2000) , 於 37 °C 下水浴 50 分鐘 , 取出一級抗體溶液 , PVDF 轉印膜以 buffer A 沖洗 3 次 , 每次 5 分鐘 ; 接著置於含 P450 2B1 二級抗體的 buffer B 中(antibody: buffer B=1:10000) , 於 37 °C 下水浴 40 分鐘 , 取出 二級抗體溶液 , PVDF 轉印膜以 buffer A 沖洗 3 次 , 每次 5 分鐘 ; 最後加入呈色液(10 ml buffer B 加入 4  $\mu$ l 3 %  $H_2O_2$  及 40  $\mu$ l 25 mg/ml 3,3' -diaminobenzine)使之呈色 , 約 15 分鐘後倒出呈色液 , PVDF 轉印膜以 buffer A 沖洗 5 分鐘 , 取出陰乾即可。

### (6) mRNA 表現之分析(Northern blotting)

#### A. Total RNA 的抽取

將肝細胞培養(3 百萬個細胞)的培養液吸除後以 PBS (4 °C )清洗二次 , 加入 1 ml TRIzol reagent , 以細胞刮取器將細胞刮下 , 放入

無菌之 1.5 ml 離心管中，在室溫下靜置 5 分鐘，加入 200  $\mu$ l chloroform，均勻混合約 15 秒後，在室溫下靜置 3 分鐘，接著於 4  $^{\circ}$ C 下以 11,000  $\times$ g 離心 15 分鐘，將上清液取出至另一離心管中，加入 650  $\mu$ l 2-isopropanol，均勻混合後靜置 15 分鐘使 RNA 沉澱，於 4  $^{\circ}$ C 下以 11,000  $\times$ g 離心 10 分鐘；將上清液倒掉所留下白色固體即為 RNA，RNA 加入 1 ml 放置 -20  $^{\circ}$ C 70 % cold ethanol 洗去殘餘的鹽類，於 4  $^{\circ}$ C 下以 5,000  $\times$ g 離心 5 分鐘，倒掉上清液，加入 1 ml 放置 -20  $^{\circ}$ C 70 % cold ethanol，即可置於 -20  $^{\circ}$ C 保存或定量 RNA。

## B. RNA 定量

將儲存於 70 % cold ethanol 之 RNA 樣品於 4  $^{\circ}$ C 下以 11,000  $\times$ g 離心 15 分鐘，倒掉上清液留下白色固體 RNA 部分，並置於室溫下陰乾，加入 60  $\mu$ l (依 RNA 沉澱量而定)無菌之 ddH<sub>2</sub>O，將 RNA 完全溶解，取 4  $\mu$ l RNA 溶液加入 996  $\mu$ l 無菌之 ddH<sub>2</sub>O 均勻混合，即可利用分光光譜儀於 260 nm 波長下測吸光值。

Total RNA 濃度依下列公式計算：

$$\text{RNA } (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = \text{吸光值(OD 260)} \times 10$$

RNA 定量後，於每個樣品中取出等量 RNA ( 10 - 20  $\mu$ g )並加入無菌之 ddH<sub>2</sub>O 至 200  $\mu$ l，隨後加入 20  $\mu$ l 3M sodium acetate 及 500  $\mu$ l

100 % iced cold ethanol , 置於-20 隔夜使 RNA 沉澱。

### C. Total RNA 電泳

#### 【緩衝液配製】：

① 10X MOPS buffer: 0.2 M MOPS, 0.05 M sodium acetate , 0.013 M EDTA, pH7.0。

② Solution B: 500  $\mu$ l 中含 250  $\mu$ l formamide、83.5  $\mu$ l 37 % formaldehyde、50  $\mu$ l 10X MOPS buffer、111.5  $\mu$ l 無菌 ddH<sub>2</sub>O、5  $\mu$ l EtBr。

③ loading buffer: 0.25 % bromophenol blue, 0.25 % xylene cyanol, 30 % glycerol。

#### 【製膠】：

取 3.3 g agarose 加入 242 ml ddH<sub>2</sub>O , 置於微波爐加熱至沸騰後(約 3 分鐘),再微波一次至沸騰(約 20 30 秒), 隨即加入 33 ml 10X MOPS buffer ; 冷卻至手可觸碰之溫度後加入 55 ml 37 % formaldehyde , 混合均勻後倒入已調好的水平製膠槽內 , 小心將液面上的氣泡清除 , 凝膠即可使用。

#### 【RNA 樣品處理】：

將儲存於-20 的 RNA 樣品取出 , 於 4 下以 11,000 xg 離心 15 分鐘 , 倒掉上清液後於室溫下風乾 ; 接著加入 20  $\mu$ l solution b , 混合

均勻，置於 95 °C 之加熱器內 5 分鐘後立即置於冰上冷卻，短暫離心後加入 4 µl loading buffer 即進行電泳。

將凝固的膠體置於電泳槽內，倒入 1X MOPS buffer，接著慢慢的將 RNA 樣品注入齒槽內，先以 75 伏特電壓至可分出 18 S 與 28 S RNA，再將電壓降至 25 伏特，進行約 15 ~ 16 小時電泳(約跑至膠體長度 3/4 處)。

#### D. RNA 轉印(transfer)

電泳完成後，將膠體以紫外線照射裁掉不要的膠體，利用拍立得相機拍攝 RNA 電泳圖。之後將膠體浸泡於 20X SSC buffer (3 M NaCl, 0.65 M sodium acetate, pH 7.0)搖晃 20 分鐘,同時剪裁與膠體大小相同之硝化纖維紙(Hybond™-N+)及 2 張濾紙並浸泡於 2X SSC buffer 中。將膠體置於由濾紙及 20X SSC buffer 組成之鹽橋上，接著再放上硝化纖維紙(Hybond™-N+)需以玻璃棒趕走氣泡，四周圍以保鮮膜包起來，依序再放上 2 張濾紙需以玻璃棒趕走氣泡。最後放上一疊吸水紙並以鐵餅重壓，於室溫下轉印 24~48 小時。

#### E. 雜交反應(Prehybridization)

【反應液】：

- ① 20X SSPE: 3 M NaCl, 0.2 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.025 M EDTA(Na<sup>2+</sup>), pH7.4。

- ② Prehybridization solution: 10.6 ml 中含 2.5 ml 20X SSPE、 2 ml 50X Denhardt's、 100  $\mu$ l ssDNA (10 mg/ml)、 5 ml 100 % formamide、 1 ml 20 % SDS。
- ③ TE buffer: 0.4 M Tris-HCl, 0.1 M EDTA。

將轉印完成之硝化纖維紙取出，浸泡於 2X SSC buffer 中 5~10 分鐘，置於紙巾上風乾，接著將轉移面朝下置於 UV 燈上進行 5~10 分鐘的 cross-link(使 RNA 與轉印膜緊密結合)，將轉印膜以 2X SSC buffer 潤溼，即可將轉印膜置於塑膠袋中(polyester barrier film)中，加入 10 ml prehybridization solution，小心將氣泡趕走將塑膠袋封口，置於 42 水浴 1~2 小時。

Hybridization buffer 的製備：取 2  $\mu$ l P450 2B1 template DNA 及 31  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O 混合均勻，置於 95 下加熱 5 分鐘(進行 denature)，立即置於冰浴中 5 分鐘，隨後加入 5  $\mu$ l 10X labeling buffer、 6  $\mu$ l dNTP mixture(各 2  $\mu$ l dATP、 dTTP、 及 dGTP)、 1  $\mu$ l DNA polymerase 及 5  $\mu$ l <sup>32</sup>P dCTP (3,000 ci/mmol, 50  $\mu$ Ci)，於 37 下水浴 1 小時後加入 250  $\mu$ l TE buffer，將 probe 注入 1 ml 針筒管柱中以 Sephadex<sup>®</sup> G25 填充，離心並收集過濾液，此過濾液置於 95 下加熱 5 分鐘，立即置於冰浴 5 分鐘，之後將含 probe 的過濾液加入已完成 prehybridization 的塑膠袋中，趕出氣泡並封口，置於 42 水浴中進行 hybridization 約 16~24

小時。

#### F. 壓片

經過 hybridization 之後，將轉印膜取出，先以 solution <sup>2</sup> (2X SSC/0.05 % SDS)清洗 3~4 次，每次 5 分鐘，接著於 52 °C 水浴下以 solution <sup>1</sup> (0.1X SSC/0.1 % SDS )清洗 1~2 次，每次 3~5 分鐘，以蓋格計數器檢測，直到游離之放射性同位素清洗乾淨為止，並檢測是否具有特異性強度的放射線帶存在。將轉印膜以保鮮膜固定於感光夾中，於暗房中放入 X 光片，最後將感光夾置於 -80 °C，壓片時間長短由放射線強弱決定。完成壓片後即可至暗房沖洗 X 光片。

#### (7) 肝細胞於培養過程中 PGE<sub>2</sub> 分泌量之測定

##### 【試劑】：

商業套組 Prostaglandin E<sub>2</sub> Enzyme Immunoassay kit (Cayman, MI)，主要所含試劑為 PGE<sub>2</sub> tracer (為接一個 acetylcholinesterase 之 PGE<sub>2</sub>)、PGE<sub>2</sub> antibody、PGE<sub>2</sub> standard、Ellman's reagent。

##### 【原理】：

利用競爭性免疫分析原理(competitive enzyme immunoassay)。樣品中的 PGE<sub>2</sub> 會與 kit 中的 PGE<sub>2</sub> tracer 競爭 PGE<sub>2</sub> monoclonal antibody，因此 antibody -PGE<sub>2</sub> complex 會與事先預塗於 well 中

之抗體結合(goat anti-mouse polyclonal antibody)。反應後，洗去 non-bound reagents，加入含有 acetylthiocholine 及 5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid)的 Ellman's reagent, PGE<sub>2</sub> tracer 上之 acetylcholinesterase 與 acetylthiocholine 反應生成 thiocholine，而 thiocholine 再與 5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid)作用產生黃色產物 5-thio-2-nitrobenzoic acid，最後利用波長 412 nm 測得吸光值。吸光值越高表示樣品中 PGE<sub>2</sub> 含量越少。

#### A. 藥品配製

- ① EIA 緩衝液配製: 將套組中的 EIA buffer 溶於 90 ml ddH<sub>2</sub>O 中。
- ② Wash buffer 配製: 將套組中的 Wash buffer 1 ml 稀釋於 400 ml ddH<sub>2</sub>O 中，再加入 200 $\mu$ l Tween-20。
- ③ Prostaglandin E<sub>2</sub> Acetylcholinesterase Tracer 配製: 將整瓶 PGE<sub>2</sub> acetylcholinesterase tracer 溶於 6 ml EIA buffer 即可。
- ④ Prostaglandin E<sub>2</sub> Monoclonal Antibody 配製: 將整瓶 PGE<sub>2</sub> monoclonal antibody 溶於 6 ml EIA buffer 即可。
- ⑤ Ellman's reagent 配製: 將整瓶 Ellman's reagent 溶於 20 ml ddH<sub>2</sub>O 即可，但須當天使用。
- ⑥ Prostaglandin E<sub>2</sub> Standard 配製:  
將整瓶 PGE<sub>2</sub> standard 加 900  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O 稀釋，接著從中取出

100  $\mu\text{l}$  加入 900  $\mu\text{l}$  EIA buffer , 此時 standard 濃度為 1000 pg/ml , 隨後以 EIA buffer 進行連續稀釋(取 500  $\mu\text{l}$  standard 加 500  $\mu\text{l}$  EIA buffer) , 將 standard 濃度分別稀釋為 1000、500、250、125、62.5、31.3、15.6 及 7.8 pg/ml。

#### B. 樣品製備

肝細胞培養完成後 , 直接收集培養皿中的培養液即可進行分析 , 若未馬上分析 , 需將培養液儲存於零下 80 。

#### C. 樣品分析

以 wash buffer 潤濕反應盤中所有 well 後 , 分別於 NSB well 與 B<sub>0</sub> well 中加入 100 及 50  $\mu\text{l}$  EIA buffer ; standard wells 中加入不同濃度的標準溶液 50  $\mu\text{l}$  ; sample wells 中則加入樣品 50  $\mu\text{l}$  ; 接著於每個 well 中加入 50  $\mu\text{l}$  PGE<sub>2</sub> tracer (除 TA 及 B wells 不加) ; 隨後於 B<sub>0</sub> well、 standard wells 及 sample wells 中加入 50  $\mu\text{l}$  PGE<sub>2</sub> antibody。將反應盤以塑膠膜封好 , 置於 4 下反應 18 小時 反應完後 , 將 well 中的反應液倒掉 , 以 wash buffer 洗 5 次 , 接著於每個 well 中加入 200  $\mu\text{l}$  Ellman' s reagent , 於 TA well 中加入 5  $\mu\text{l}$  PGE<sub>2</sub> tracer。隨後於擺盪器上暗反應 60-90 分鐘即可利用 ELISA reader 於 412 nm 下測吸光值。



### 【計算公式】

$$B/B_0 (\%) = \frac{\text{Abs. of standards or samples} - \text{NSB Abs.}}{B_0 \text{ Abs.} - \text{NSB Abs.}} \times 100$$

由上列計算公式可求得一 PGE<sub>2</sub> 之標準曲線圖(縱軸為 % B/B<sub>0</sub> , 橫軸為 PGE<sub>2</sub>(pg)之 log 值) , 利用此標準曲線即可求出培養液中 PGE<sub>2</sub> 的濃度。

### 三、統計分析

使用 one way analysis of variance (ANOVA)進行統計分析 , 並以 Duncan test 進行顯著性差異分析 , 當 p < 0.05 時表示有顯著差異

# 結 果

## n-3、n-6 脂肪酸添加對細胞脂肪酸組成之影響

由圖一 圖四及表一結果顯示，依照樣品在 GC 系統分析中出現的波峰位置，證明培養液中添加 n-3 及 n-6 脂肪酸確實會增加細胞中此種脂肪酸的比例。

表一結果顯示，為添加脂肪酸之對照組則細胞中沒有 EPA、DHA；培養液中添加 LA (18:2, n-6)，則細胞中 LA (18:2, n-6)組成百分比為 17.6 %，高於 AA、EPA、DHA 添加組；培養液中添加 AA (20:4, n-6)則細胞中 AA (20:4, n-6)組成百分比為 18.9 %，高於 LA、EPA、DHA 添加組；培養液中添加 EPA (20:5, n-3)，則細胞中 EPA (20:5, n-3)組成百分比為 6.6 %，高於 LA、AA、DHA 添加組；培養液中添加 DHA (22:6, n-3)則細胞中 DHA (22:6, n-3)組成百分比為 16.6 %，高於 LA、AA、EPA 添加組。表示添加脂肪酸確實會影響細胞脂肪酸組成。

## 添加不同濃度脂肪酸對肝細胞乳酸去氫 滲 漏 率 影響

肝細胞以不同濃度脂肪酸處理，由圖五結果顯示，培養液中添加 50  $\mu$ M 脂肪酸，肝細胞乳酸去氫 滲 漏 率 於 %，表示此時肝細胞是健康的狀態。隨著培養液中脂肪酸濃度增加(100 300  $\mu$ M)，肝

細胞乳酸去氫 滲 漏也明顯提高，表示肝細胞處於不健康的狀態。

## **Indomethacin 對花生四烯酸影響 PB 誘發 CYP 2B1 蛋白質表現之劑量關係**

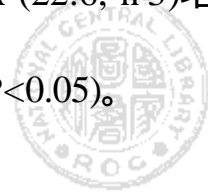
肝細胞經 indomethacin 處理 24 小時後，由圖六結果顯示，indomethacin 預處理花生四烯酸可減少 AA 抑制 PB 誘發 CYP 2B1 蛋白質之表現，indomethacin 濃度在 20  $\mu$ M 時效果最明顯。indomethacin 濃度在(40  $\mu$ M 和 80 $\mu$ M)時，抑制作用並沒有更進一步的增加。

## **添加或不添加 indomethacin 對 n-3 及 n-6 脂肪酸影響 PB 誘發 CYP 2B1 蛋白質及 mRNA 表現之影響**

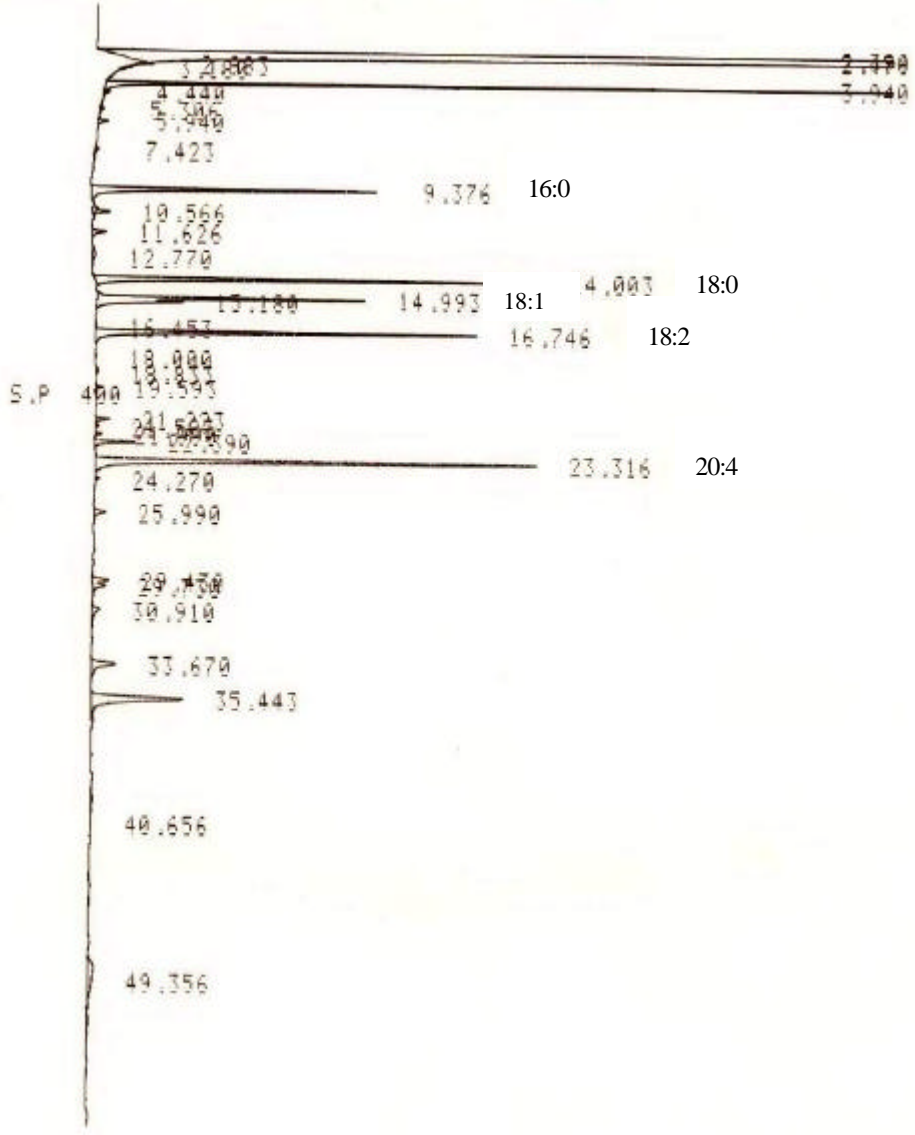
由圖七結果顯示，培養液中沒有添加 indomethacin，PB 誘發 CYP 2B1 蛋白質表現較有添加 indomethacin 組別為低。在沒有添加 indomethacin 下，n-3、n-6 脂肪酸影響 PB 誘發 CYP 2B1 蛋白質表現以 AA 組表現最弱；添加 indomethacin 後，n-3、n-6 脂肪酸影響 PB 誘發 CYP 2B1 蛋白質表現增加但效果則不甚明顯。培養液中添加或不添加 indomethacin 對 n-3 及 n-6 脂肪酸影響 PB 誘發 CYP 2B1 mRNA 表現之效果也與蛋白質表現有相同趨勢(圖八)。

## **n-3 及 n-6 脂肪酸對肝細胞合成 PGE<sub>2</sub> 之影響**

由圖九結果顯示，以 PB 誘發初代肝細胞 CYP 2B1 表現時，添加 indomethacin 對 LA (18:2, n-6)、AA (20:4, n-6)及 EPA (20:5, n-3)培養液中 PGE<sub>2</sub> 濃度並沒有降低，反而比沒有添加 indomethacin 處理組培養液中 PGE<sub>2</sub> 濃度要稍高；添加 indomethacin 對 DHA (22:6, n-3)培養液中 PGE<sub>2</sub> 濃度有降低，但是統計上沒有顯著差異(P<0.05)。

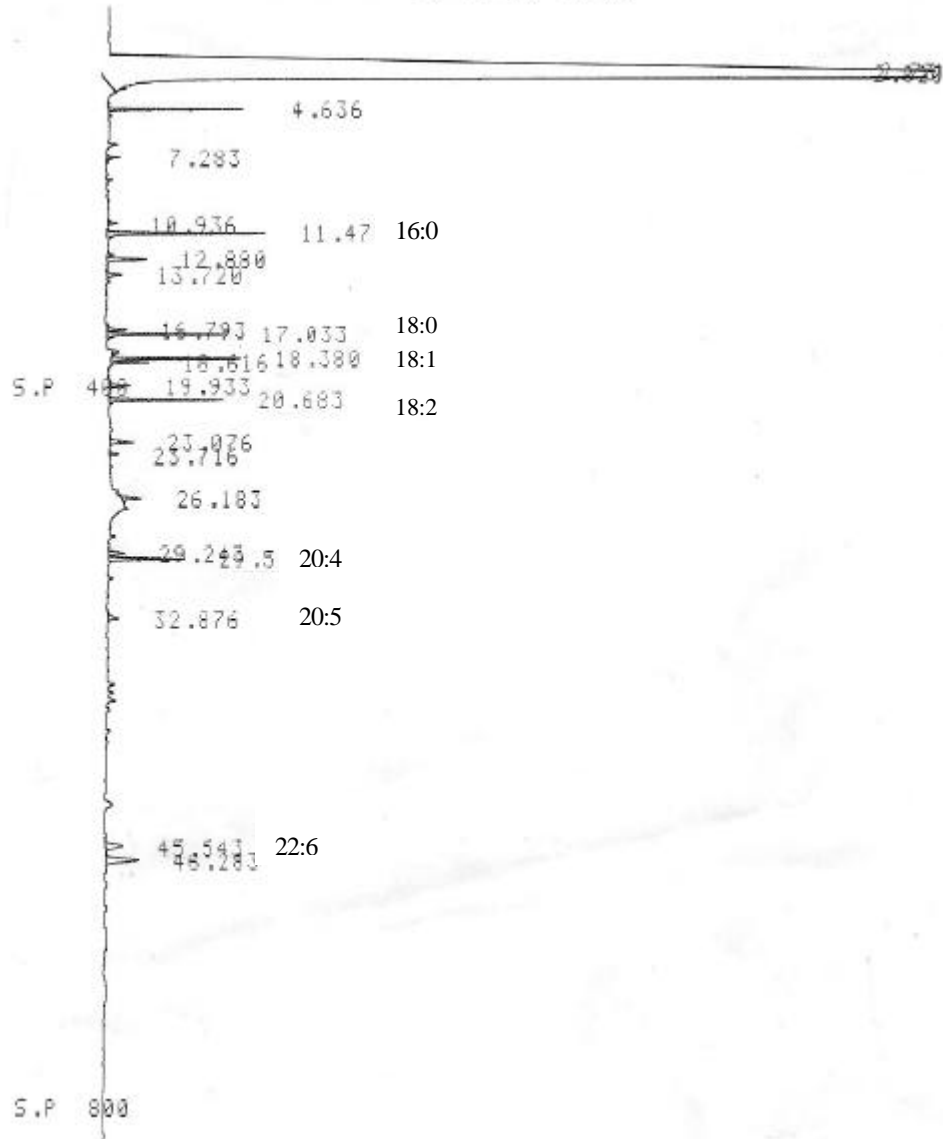


CH. 1 C.S 2.50 ATT 3 OFFS 10 09/08/00 17:34



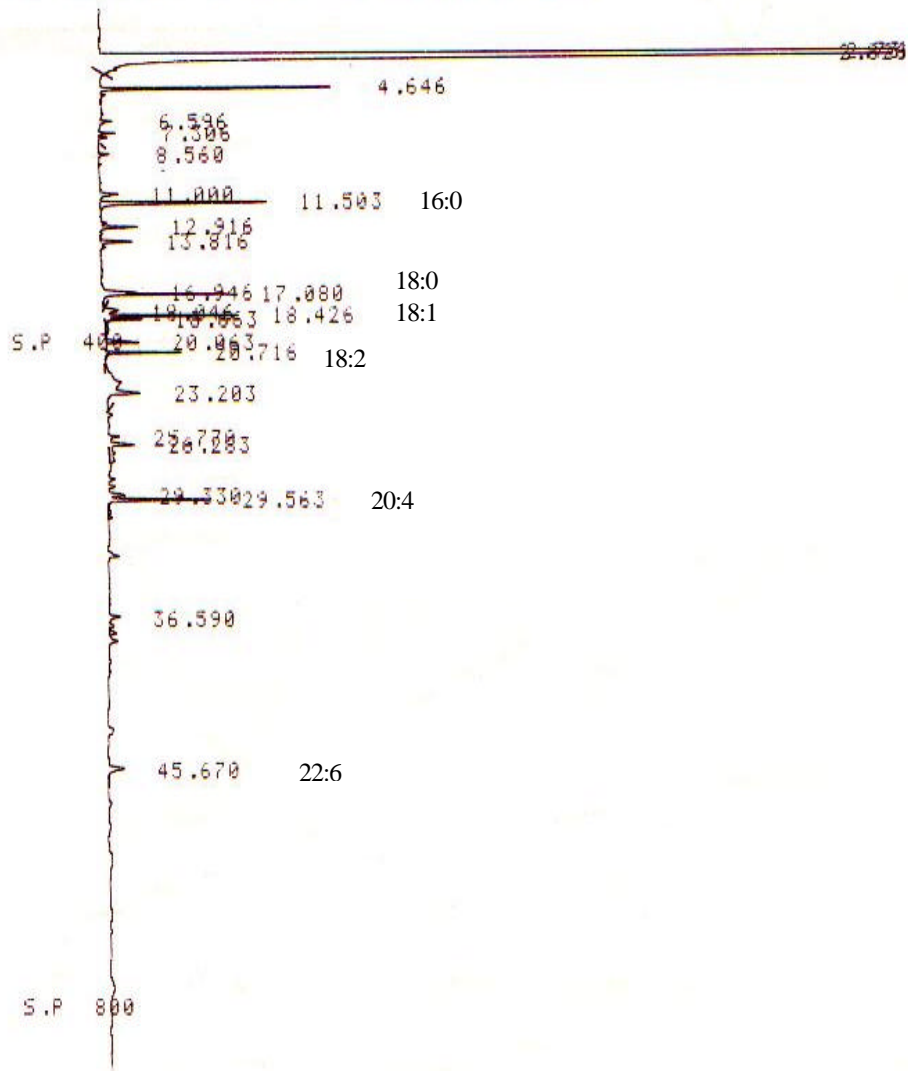
圖一. 對照組細胞脂肪酸組成之影響

CH. 1 C.S 2.50 ATT 1 OFFS 10 07/12/01 18:59



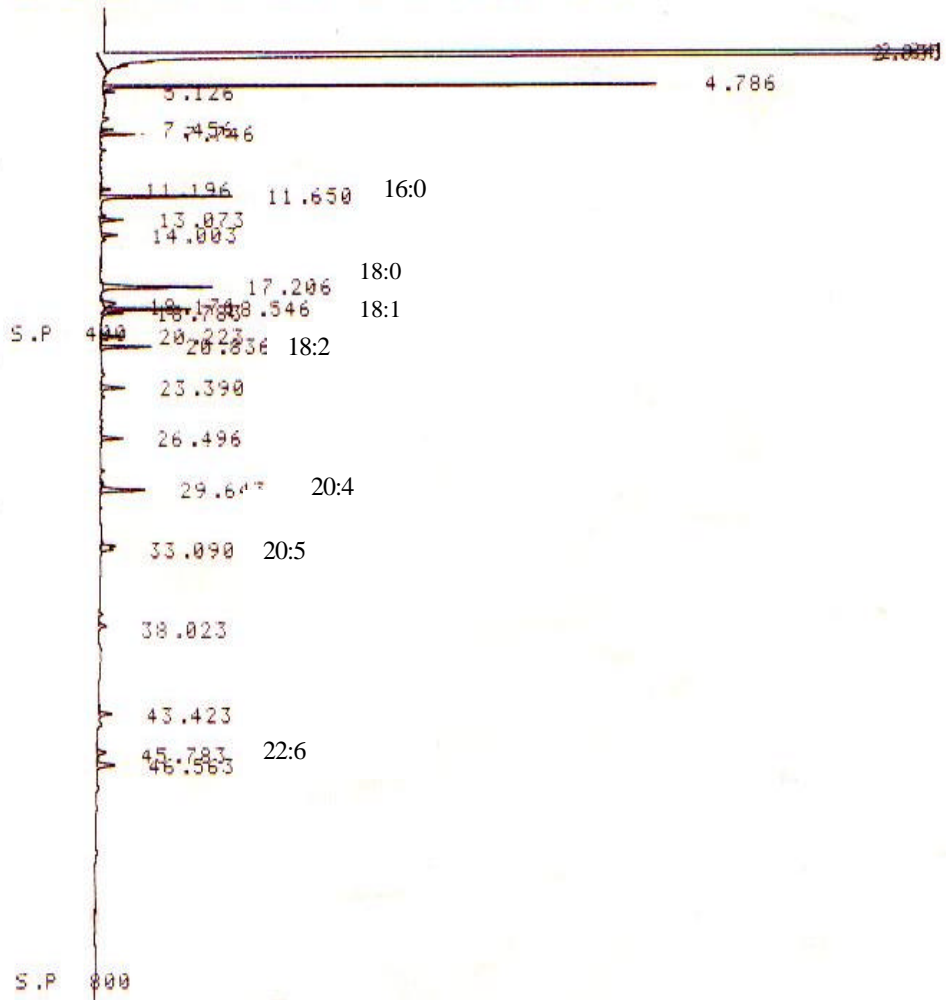
圖一. 亞麻油酸添加對細胞脂肪酸組成之影響

2A. 1 C.S 2.50 ATT 1 OFFS 10 07/12/01 20:09



圖二. 花生四烯酸添加對細胞脂肪酸組成之影響

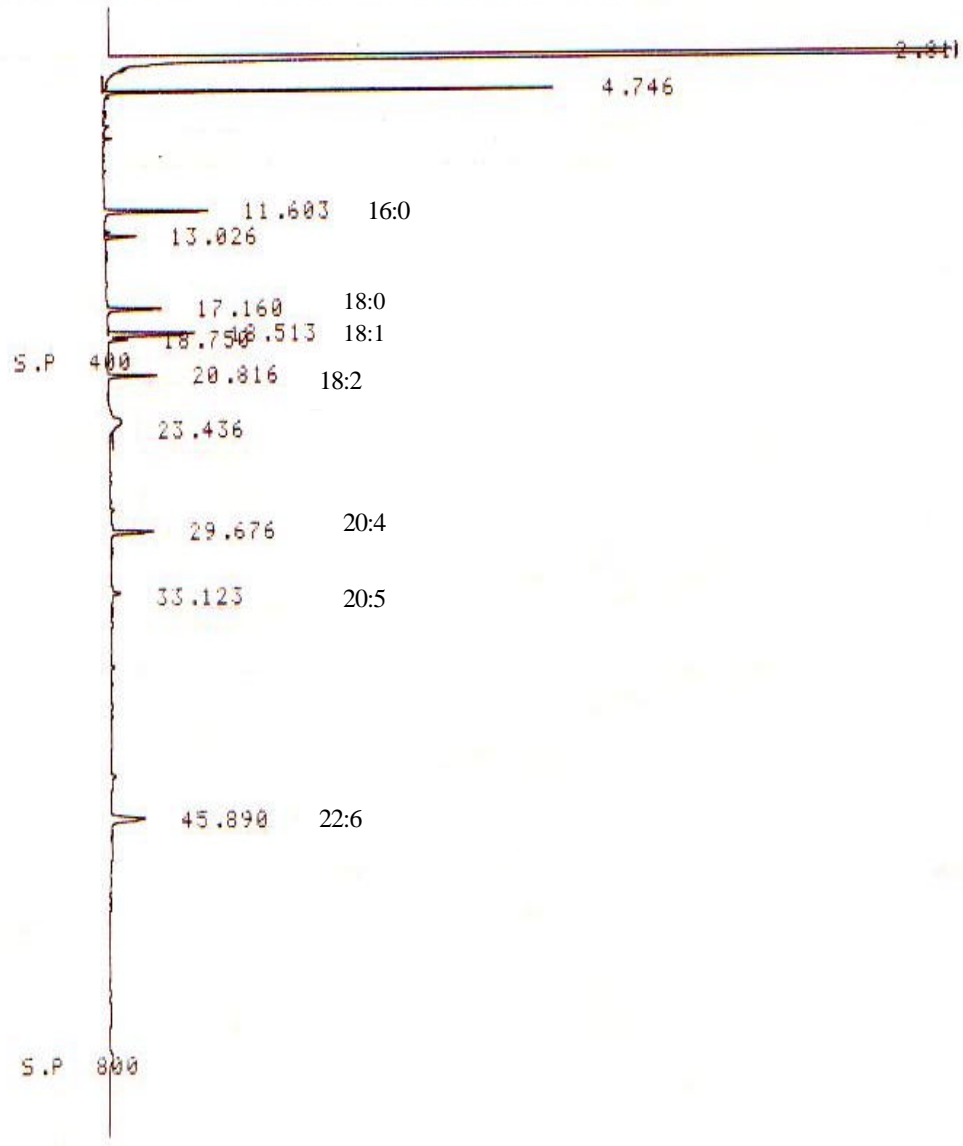
CH. 1 C.S 2.50 ATT 1 OFFS 10 07/18/01 14:20



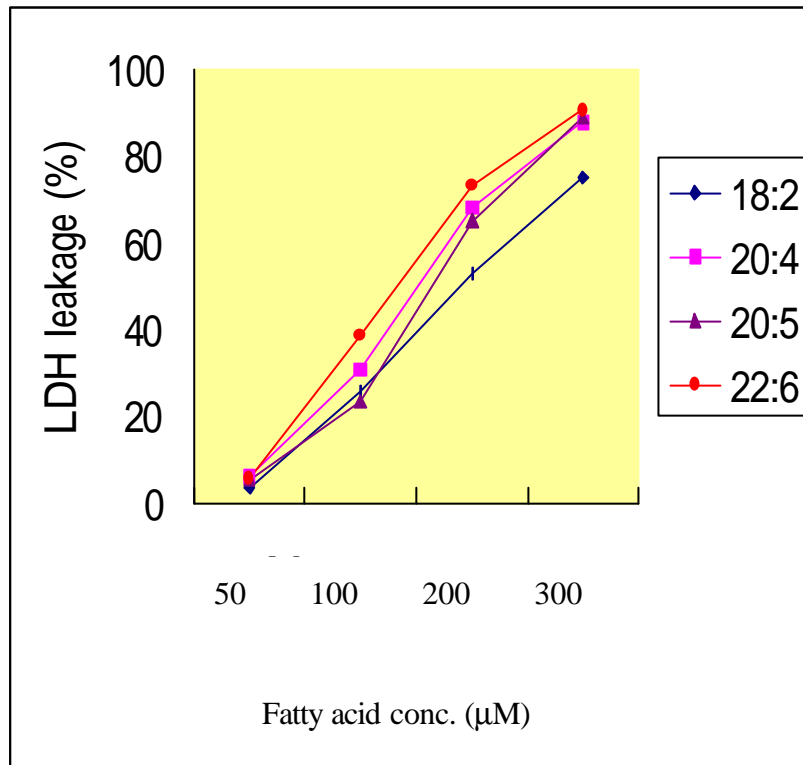
圖三. 二十碳五烯酸添加對細胞脂肪酸組成之影響



CH. 1 C.S 2.50 ATT 1 OFFS 10 07/18/01 15:30

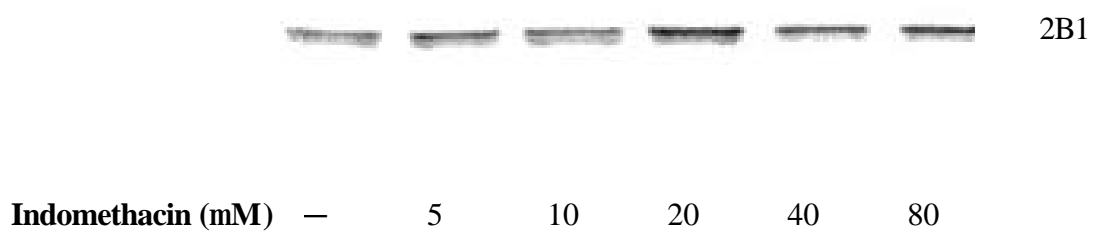


圖四. 二十二碳六烯酸添加對細胞脂肪酸組成之影響

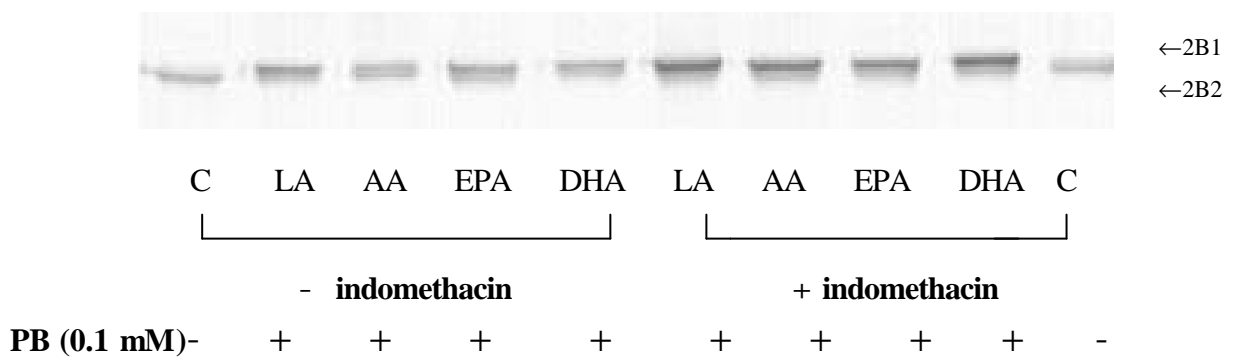


圖五. 添加不同濃度脂肪酸對肝細胞乳酸去氫 滲 漏之影響

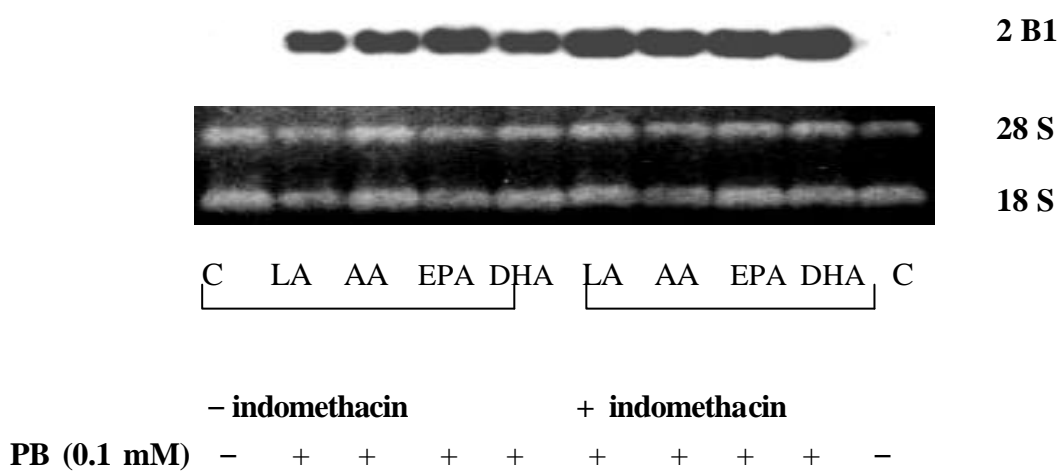
細胞培養 24 小時



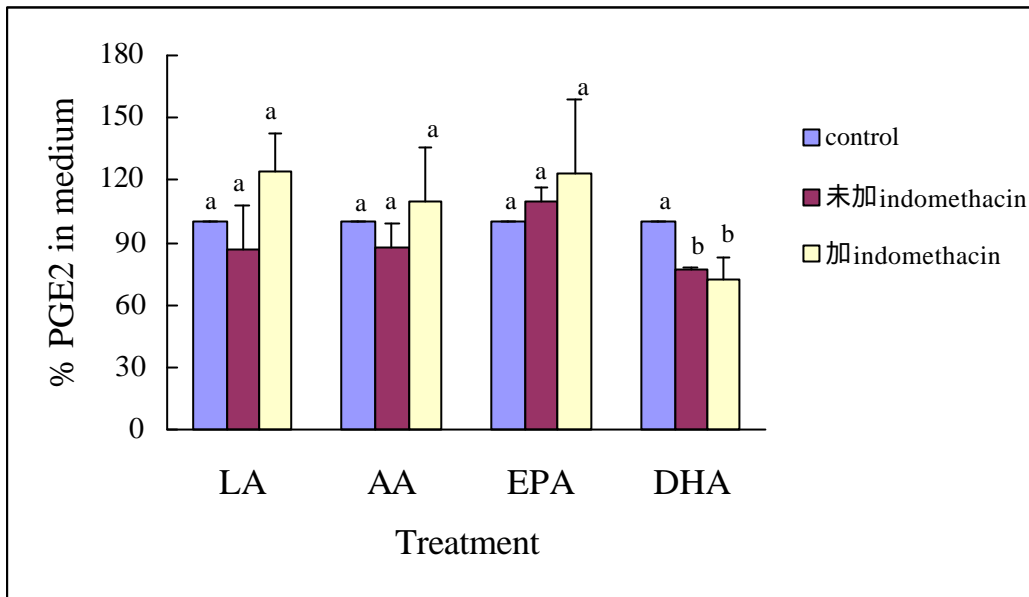
圖六. Indomethacin 對花生四烯酸影響 PB 誘發 P450 2B1 蛋白質表現  
之劑量關係



圖七. 添加或不添加 indomethacin 對 n-3 及 n-6 脂肪酸影響 PB 誘發 P450 2B1 蛋白質表現之影響



圖八. 添加或不添加 indomethacin 對 n-3 及 n-6 脂肪酸影響 PB 誘發 P450 2B1 mRNA 表現之影響



圖九. n-3 及 n-6 脂肪酸對肝細胞合成 PGE<sub>2</sub> 之影響

Values are means  $\pm$ SD (n=3). Groups that not sharing the same letter (a,b) are significantly different ( $p < 0.05$ )

以 control 組(不添加 PB 及 indomethacin)為 100 %

PB: 0.1 mM

表一. n-3 及 n-6 脂肪酸添加對於細胞脂肪酸組成之影響

	C	18:2 LA	20:4 AA	20:5 EPA	22:6 DHA
	%				
16:0	16.1	23.0	25.1	24.9	24.0
18:0	21.1	18.4	19.8	24.0	13.0
18:1	13.1	18.8	20.8	17.2	21.2
18:2	13.2	17.6	12.4	10.5	12.5
20:4	11.5	12.8	18.9	12.5	11.7
20:5	0	3.7	3.5	6.6	1.03
22:6	0	5.6	3.0	4.2	16.6

## 討 論

In vitro 系統中缺乏穩定誘發表現 CYP 2B1 狀態，因此對於 PB 如何誘發 CYP 2B1 表現的機制還不太清楚。最近，證實 PB enhancer 活性位於大鼠 CYP 2B2 基因及小鼠 Cyp 2b10 基因 DNA 序列-2.3 kbp 的區域(Trottier et al., 1995; Honkakoski et al., 1997)。近年來有文獻指出以初代肝細胞的培養模式來再現 in vivo 系統中 PB 的誘發作用(Waxman et al., 1990)。

本實驗主要目的是利用初代肝細胞的培養模式，探討 n-3 及 n-6 脂肪酸對 PB 誘發肝細胞 CYP 2B1 表現之影響。首先要確定添加的脂肪酸是否可進入細胞，利用氣相層析儀來證實添加脂肪酸對細胞脂肪酸組成之影響。結果顯示，添加 n-3 及 n-6 脂肪酸確實會影響細胞脂肪酸組成(圖一 圖四)(表一)。Waggoner 等人(1990)提出在細胞培養模式中添加脂肪酸，脂肪酸會與細胞質的脂肪酸轉運蛋白(FABP)結合；FABP 運輸脂肪酸通過細胞膜，可增加脂肪酸運送的速率。Hart 等人(1990)指出在豬的肺動脈內皮細胞(PAEC)培養模式中添加脂肪酸會改變 PAEC 脂肪酸的組成。長鏈多元不飽和脂肪酸，鍵結於細胞膜磷脂質上，可增加細胞膜的流動性(Castuma et al., 1983)。但因具有較多的雙鍵容易受到自由基之攻擊而產生脂質過氧化反應造成細胞



傷害(Hart et al., 1991)。Mikkelsen 等人(1993)在大鼠肝細胞中發現添加 0.5 mM highly unsaturated fatty acid (HUFA)會對細胞產生毒性增加乳酸去氫 滲 漏，原因可能是 HUFA 產生脂質過氧化反應所致。Mikkelsen 等人(1994)在細胞中添加 50  $\mu$ M tocopherol 以防止脂質過氧化反應產生，但不能防止氧化壓力誘發造成細胞傷害。

本實驗利用初代肝細胞培養模式添加不同濃度脂肪酸來觀察它們對肝細胞乳酸去氫 滲 漏之影響。結果顯示(圖五)，隨著培養液中脂肪酸濃度增加(50 300  $\mu$ M)，肝細胞乳酸去氫 滲 漏也跟著提高。本實驗在培養液中添加 10  $\mu$ M  $\alpha$ -tocopheryl succinate 以防止脂質過氧化反應造成細胞傷害。結果顯示(圖五)，n-3 及 n-6 脂肪酸濃度在 50  $\mu$ M 時，肝細胞乳酸去氫 滲 漏 率 於%，表示肝細胞處於健康狀況，而脂肪酸濃度增加(100 300  $\mu$ M)時肝細胞乳酸去氫 滲 漏率也跟著提高大於 20 %，所以本實驗脂肪酸添加濃度選擇 50  $\mu$ M。

之前的研究顯示，日糧中油脂的種類及含量確實會影響動物中 CYP450 酵素活性，PB 可以經由促進基因轉錄的過程誘發肝臟中 CYP 2B 表現(Waxman et al., 1992)。本實驗結果顯示(圖七)，沒有添加 indomethacin，n-3 及 n-6 脂肪酸對於 PB 誘發 CYP 2B1 蛋白質表現以 AA (20:4, n-6)表現最弱。結果顯示(圖八)，不添加 indomethacin，AA (20:4, n-6)影響 PB 誘發 CYP 2B1 mRNA 表現之影響與其它脂肪酸無

顯著差異，此結果與蛋白質表現結果不一致。因此推測可能 AA (20:4, n-6) 影響 CYP 2B1 在轉譯(translation)之過程。Rose 等人(1990)利用 in vitro 實驗發現 LA (18:2, n-6) 會促進乳癌細胞株生長；LA 可經由 cyclooxygenase 和 lipoxygenase 途徑產生 prostaglandin 及 leukotriene。Buckman 等人(1991)提出在小鼠乳腺腫瘤細胞株使用 cyclooxygenase 抑制劑會抑制前列腺素之合成。本實驗添加 n-3 及 n-6 PUFA 到肝細胞中，結果顯示 AA (20:4, n-6) 在所有的脂肪酸中對於 PB 誘發 CYP 2B1 蛋白質表現有最弱的效果(圖七)。推論 AA (20:4, n-6) 可能是經由環氧化 PGE<sub>2</sub>，而 PGE<sub>2</sub> 在以前的研究中發現高劑量時(100, 1000 nM) 可以抑制 PB 誘發 CYP 2B1 蛋白質及 mRNA 表現(Tsai et al., 1999)。因此本實驗也添加 indomethacin (COX inhibitor) 來抑制 PGE<sub>2</sub> 的產生。結果顯示 indomethacin 在 20 μM 時可以提升 AA 降低 PB 誘發 CYP 2B1 之表現 (圖六)，indomethacin 濃度增至(40 80 μM) 時並無更進一步的提升作用。本實驗以添加 indomethacin 來觀察 n-3 及 n-6 脂肪酸影響 PB 誘發 CYP 2B1 蛋白質表現之影響。結果顯示(圖七)，細胞利用 indomethacin 預處理 AA (20:4, n-6) 對 PB 誘發 CYP 2B1 蛋白質表現之影響與其它脂肪酸無顯著差異。添加 indomethacin 可增加 PB 誘發 CYP 2B1 蛋白質之表現；在 mRNA 的部分也有相同的結果(圖八)。

在肝臟中，肝細胞是位於肝竇狀隙間，它們處於內皮細胞和巨噬細胞(Kupffer cell)附近(Harbrecht et al., 1996)，這兩種細胞可分泌前列腺素、細胞激素，進而影響肝細胞的生理功能(Harbrecht et al., 1995)。由於前列腺素在生理功能上扮演多樣而且重要的角色，n-3、n-6 脂肪酸因會影響前列腺素的合成在生理上亦扮演重要的角色。研究發現，當動物攝取 n-3 PUFA 時，EPA (20:5, n-3)及 DHA (22:6, n-3)會降低 PGE<sub>2</sub> 的合成(Harris, 1996)；相反的，若增加 n-6 PUFA 攝取如 AA (20:4, n-6)、LA (18:2, n-6)則會促進 PGE<sub>2</sub> 的合成(Simopoulos, 2000)。

本實驗同時探討 n-3 及 n-6 脂肪酸對肝細胞合成 PGE<sub>2</sub> 之影響，結果顯示(圖九)以 PB 誘發初代肝細胞之 CYP 2B1 表現時，添加 indomethacin 對 LA (18:2, n-6)、EPA (20:5, n-3)及 AA (20:4, n-6)培養液中 PGE<sub>2</sub> 濃度並沒有降低，反而比沒有添加 indomethacin 脂肪酸處理組培養液中 PGE<sub>2</sub> 濃度要稍高；添加 indomethacin 對 DHA (22:6, n-3)培養液中 PGE<sub>2</sub> 濃度有降低但沒有達到統計上顯著差異(P<0.05)，推測 n-3 及 n-6 PUFA 對 CYP 2B1 表現的影響可能與 PGE<sub>2</sub> 的合成無關，而是另有其他機制參與。文獻指出(1987)巨噬細胞(Kupffer cell)添加 indomethacin 於培養液中培養 24 小時後，收集培養液分析 PGE<sub>2</sub>；PGE<sub>2</sub> 會抑制巨噬細胞(Kupffer cell)自然毒殺活性；若添加 indomethacin 於培養液中可增加巨噬細胞(Kupffer cell)的活性並降低 PGE<sub>2</sub> 的合成。此

實驗添加 indomethacin 於培養液中的條件與本實驗條件一樣，但是本實驗結果與預期結果並不相符，可能培養的時間點不同，所以添加 indomethacin 於培養液中 PGE<sub>2</sub> 濃度並沒有降低。此外，未必所有的肝實質細胞(hepatic parenchymal cell)都會產生 PGE<sub>2</sub> (Michelle et al., 1999)。

有學者指出 PUFA 影響基因表現透過第二訊息傳遞改變細胞膜磷脂質成分及二十碳烯酸之生成(Sellmayer et al., 1997)。PUFA 可能是透過直接或間接的途徑來調控基因的表現，如在 3T3-L1 脂肪細胞培養模式中，AA (20:4, n-6)經由 cyclooxygenase 途徑轉變成 PGE<sub>2</sub> 會抑制 FAS 及 S14 mRNAs 表現(Jump et al., 1999)。在 3T3-L1 脂肪細胞培養模式中，AA (20:4, n-6)轉變成 PGE<sub>2</sub> 刺激 DNA 合成及有絲分裂透過 protein kinase C 調控途徑活化 c-Fos 和 Egr-1 之表現(Danesch et al., 1994)。在肝實質細胞培養模式中，AA (20:4, n-6)則不需要經由 cyclooxygenase 途徑來抑制脂質相關基因表現(Jump et al., 1999)。

PPARs (peroxisome proliferator-activated receptors)是脂肪酸活化細胞核的受體，是由類固醇、甲狀腺、視網膜次家族所組成的細胞核受體(Issemann et al., 1990)。Jump 等人(1999)指出 n-3 及 n-6 PUFA 快速抑制 FAS (fatty acid synthase)、S14 protein (S14)、stearoyl COA desaturase 1 (SCD 1)及 L-pyruvate kinase (L-PK)表現不需要透過 PPAR - 或

cyclooxygenase 途徑就可以調控肝臟基因之轉錄作用。

飲食中 n-6/n-3 的比例需要多少至今還不清楚,有學者(1991)提出建議飲食中 n-6/n-3 的比例 1:1,現在的飲食習慣 n-6/n-3 的比例約為 20-25:1。大多數飲食研究,建議飲食中多食用 n-3 PUFA 來取代 n-6 PUFA;大鼠實驗發現攝取富含 EPA 及 DHA 的魚油,有效提昇免疫細胞的功能;人體實驗發現具有降低血脂及膽固醇因此可預防冠狀心臟疾病的發生及關節炎及其他炎症(Jeffery et al., 1997)。但是飲食中過度取代 n-6 PUFA 會降低細胞中 n-6 PUFA 含量及 n-6 PUFA 缺乏會造成不正常的生長和發育(Simopoulos, 1991;Singer et al., 1990)。所以飲食中總 PUFA 含量及 n-6/n-3 的比例最好是均衡攝取(Jeffery et al., 1997)。

## 結 論

由結果發現，n-3 及 n-6 PUFA 添加到初代肝細胞培養液中，確實會影響 PB 誘發細胞色素 P450 2B1 表現，此外發現添加 indomethacin 於培養液中會增加 PB 誘發肝細胞 P450 2B1 蛋白質及 mRNA 之表現。但是本實驗 n-3 及 n-6 PUFA 組別添加或不添加 indomethacin 對肝細胞合成 PGE<sub>2</sub> 並無顯著影響，似乎顯示，n-3 及 n-6 PUFA 對 P450 2B1 表現的影響可能與 PGE<sub>2</sub> 的合成無關，而是另有其他機制參與。

## 參考文獻

魏正舒. (1997) Stryer's 生物化學.合記圖書出版社.台北市.

陳振東. (1999) 生物化學圖解.藝軒圖書出版社.台北市.

Alleva, D.G., Burger, C.J., Elgert, K.D. (1995) Tumor-induced regulation of suppressor macrophage nitric oxide and TNF- $\alpha$  production. Role of tumor-derived IL-10, TGF- $\beta$ , and prostaglandin E<sub>2</sub>. J Immunol 153: 1674-1686.

Barzanti, V., Maranesi, M., Cornia, L.G., Malavolti, M., Mordenti, T., Pregolato, P. (1999) Effect of dietary oils containing different amounts of precursor and derivative fatty acids on prostaglandin E<sub>2</sub> synthesis in liver kidney and lung of rats. Prostaglandins Leukotr Essent Fatty Acids 60: 49-54.

Beck, N.B., Omiecinski, C.J. (1999) Lack of modulation by Phenobarbital of cyclic AMP levels or protein kinase A activity in rat primary hepatocytes. Biochem Pharmacol 58: 1109-1114.

Baylink, D.J. (1993) Growth factors to stimulate bone formation. J Bone Min Res 8: S565-S572.

Boie, Y., Stocco, R., Sawyer, N. (1997) Molecular cloning and characterization of the four rat prostaglandin E<sub>2</sub> prostanoid receptor subtypes. Eur J Pharmacol 340:227-241.

Buckman, D.K., Hubbard, N.E., Erickson, K.L. (1991) Eicosanoid and linoleate-enhanced growth of mouse mammary tumor cells. Prostaglandins Leukotr Essent Fatty Acids 44: 177-184.

Capdevilla, J.H., Karara, A., Waxman, D.J., Matrin, M.V., Falck, J.R., Guenguerich, F.P. (1990) Cytochrome P450 enzymes specific control of the regio- and enantiofacial selectivity of microsomal arachidonic acid epoxygenase. J Biol Chem 265: 10865-10871.

Chiolero, A., Rznar, G., Burnier, M. (2000) Selective inhibitors of type 2 cyclooxygenase less renal effects than the classical non-steroidal anti-inflammatory agents. Nephrologie 21: 425-430.

Chen, H.W., Li, C.K., Wu, M.H., Ou, C.C., Sheen, L.Y. (1997) Amount and type of dietary lipid modulate rat hepatic cytochrome P450 activity. Nutr Cancer 29: 174-180.

Danesch, U., Weber, P.C., Sellmayer, A. (1994) Arachidonic acid increases c-Fos and Egr-1 mRNA in 3T3 fibroblast by formation of PGE<sub>2</sub> and activation of protein kinase C. J Biol Chem 269: 27258-27263.

Dogra, S.C., May, B.K. (1996) Phenobarbital induced activation of CYP 2H1 and 5-aminolevulinate synthase genes in chick embryo hepatocytes is blocked by an inhibitor of protein phosphorylation. Arch Biochem Biophys 327: 271-278.



Dyerberg, J., Mortensen, J.Z., Nielsen, A.H., Schmidt, E.B. (1982) n-3 Polyunsaturated fatty acids and ischaemic heart disease. *Lancet* 2:614.

Endres, S., Caterina, R., Schmidt, E.B., Kristensen, S.D. (1995) N-3 polyunsaturated fatty acids. *Eur J Clin Invest* 25: 629-638.

Farrell, G.C. (1987) Drug metabolism in extrahepatic diseases. *Pharmacol Ther* 35: 375-404.

Flicj, P.K., Chen, J., Vagalos, P.R. (1977) Effect of dietary linoleate on synthesis and degradation of fatty acid synthetase from rat liver. *J Biol Chem* 252: 4242-4249.

Gonzalez, F.J. (1988) The molecular biology of cytochrome P-450s. *Pharmacol Rev* 40: 243-288.

Gram, T.E. (1980) Extrahepatic metabolism of drugs and other foreign compounds. *Spectrum* 1-601.

Grinstein, M., Canepa, E.T., Llambias, E.B. (1989) Studies on regulatory mechanisms of heme biosynthesis in hepatocytes from normal and experimental-diabetic rats. Role of Camp. *Biochem Cell Biol* 67: 751-758.

Guengerich, F.P. (1995) Influence of nutrients and other dietary materials on cytochrome P450 enzymes. *Am J Clin Nutr* 61 (suppl): 651S-658S.

Gonzalez, F.J., Gelboin, H.V. (1994) Role of human cytochromes P450 in the

metabolic activation of chemical carcinogenes and toxins. *Drug Metab Rev* 26: 165-183.

Guengerich, F.P., Shimada, T. (1991) Oxidation of toxic and carcinogenic chemicals by human cytochrome P450 enzymes. *Chem Res Toxicol* 50: 1471-1478.

Guengerich, F.P., Brian W.R., Sari, M.A., Ross, J.T. (1991) Expression of mammalian cytochrome P450 enzymes using yeast-based vectors. *Methods Enzymol* 206: 130-145.

Guengerich, F.P. (1992) Human cytochrome P450. *Life Sci* 50: 1471-1478.

Harris, W.S. (1996) n-3 Fatty acids and lipoproteins: comparison of results from human and animal studies. *Lipids* 31: 243-252.

Hart, C.M., Tolson, J.K., Block, E.R. (1990) Fatty acid supplementation protects pulmonary artery endothelial cells from oxidant injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* 3: 479-489.

Hart, C.M., Tolson, J.K., Block, E.R. (1991) Supplemental fatty acids alter lipid peroxidation and oxidant injury in endothelial cells. *Am J Physiol* 260: L483-490.

Harbrech, B.G., Billar, T.R. (1995) The role of nitric oxide in Kupffer cell hepatocyte interaction. *Shock* 3: 79-87.

Harbrech, B.G., Kim, Y.M., Wirant, R.A., Shapiro, R.A., Billiar, T.R. (1996) PGE<sub>2</sub> and LTB<sub>4</sub> inhibit cytokine stimulated nitric oxide synthase type 2 expression in isolated rat hepatocytes. *Prostaglandins* 52: 103-116.

Honkakoski, P., Negishi, M. (1997) Characterization of a phenobarbital responsive enhancer module in mouse P450 Cyp2b10 gene. *J Biol Chem* 272: 14943-14949.

Honkakoski, P., Zelko, I., Sueyoshi, T., Negishi, M. (1998) The nuclear orphan receptor CAR-retinoid X receptor heterodimer activates the phenobarbital-responsive enhancer module of the CYP2B gene. *Mol Cell Biol* 18: 5652-5658.

Honkakoski, P., Moore, R., Washburn, K. A., Negishi, M. (1998) Activation by diverse xenochemicals of the 51-base pair phenobarbital responsive enhancer module in CYP 2B10 gene. *Mol Pharmacol* 53: 597-601.

Honkakoski, P., Moore, R., Gynther, J., Negishi, M. (1996) Characterization of phenobarbital inducible mouse Cyp2b10 gene transcription in primary hepatocytes. *J Biol Chem* 271: 9746-9753.

Hughes, F.J., BATTERY, L.D., HUKKANEN, M.V., O' DONNELL, A., MACLOUF, J., POLAK, J.M. (1999) Cytokine-induced prostaglandin E<sub>2</sub> synthesis and cyclooxygenase-2 activity are regulated both by a nitric oxide dependent and independent mechanism in rat osteoblasts in vitro. *J Bio Chem* 274: 1776-1782.

Hwang, D., Rhee, S.H. (1999) Receptor-mediated signaling pathways: potential targets of modulation by dietary fatty acids. *Am J Clin Nutr* 70: 545-556.

Ishii, K., Maeda, K., Kamataki, T., Kato, R. (1986) Mutagenic activation of aflatoxin AFB<sub>1</sub> by several forms of purified cytochrome P450. *Mutat Res* 174: 85-88.

Issemann, I., Green, S. (1990) Activation of a member of the steroid hormone receptor super family by peroxisome proliferators. *Nature* 347: 654-650.

James, M.J., Gibson, R.A., Cleland, L.G. (2000) Dietary polyunsaturated fatty acids and inflammatory mediator production. *Am J Clin Nutr* 71: 343S-348S.

Jeffery, N.M., Newsholme, E.A., Calder, P.C. (1997) Level of polyunsaturated fatty acids and the n-6 to n-3 polyunsaturated fatty acid ratio in the rat diet alter serum lipid levels and lymphocyte functions. *Prostaglandins Leuko Essent Fatty Acids* 57: 149-160.

Jump, D.B., Thelen, A., Ren, B., Mater, M. (1999) Multiple mechanisms for polyunsaturated fatty acid regulation of hepatic gene transcription. *Prostaglandins Leuko Essent Fatty Acids* 60: 345-349.

Jump, D.B., Clarke, S.D., Thelen, A., Liimatta, M. (1994) Coordinate regulation of glycolytic and lipogenic gene expression by polyunsaturated fatty acids. *J Lipid Res* 35: 1076-1084.

Jump, D.B., Clarke, S.D., Dougald, O.M., Thelen, A. (1993) Polyunsaturated fatty acids inhibit S14 gene transcription in rat liver and cultured hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci* 90: 8454-8458.

Karmali, R.A., Reichel, P., Cohen, L.A., Terano, T., Hirai, A., Tamura, Y., Yoshida, S. (1987) The effects of dietary omega-3 fatty acids on the DU-145 transplantable human prostatic tumor. *Anticancer Res* 7: 1173-1180.

Kotani, M., Tanaka, I., Ogawa, Y., Suganami, T., Matsumoto, T., Muro, S., Yamamoto, Y., Sugawara, A., Yoshimasa, Y., Sagawa, N., Narumiya, S., Nakao, K. (2000) Multiple signal transduction pathways through two prostaglandin E receptor EP3 subtype isoforms expressed in human uterus. *J Clin Endocr Metab* 85: 4315-4322.

Kagan, V.E., Quinn, P.J. (1988) The interaction of alpha-tocopherol and homologues with shorter hydrocarbon chains with phospholipid bilayer dispersions. A fluorescence probe study. *Eur J Biochem* 171: 661-667.

Kliwer, S.A., Moore, J.T., Wade, L., Staudinger, J.L., Watson, M.A., Jones, S.A., McKee, D.D., Oliver, B.B., Willson, T.M., Zetterstrom, R.H., Perlmann, T., Lehmann, J.M. (1998) An orphan nuclear receptor activated by pregnanes defines a novel steroid signaling pathway. *J Clin Invest* 102: 1016-1023.

Krishna, D.R., Klotz, U. (1994) Extrahepatic metabolism of drugs in humans. *Clin Pharmacokinet* 26: 144-160.

Kocarek, T.A., Schuetz, E.G., Strom, S.C., Fisher, R.A., Guzelian, P.S. (1995) Comparative analysis of cytochrome P450 3A induction in primary cultures of rat, rabbit, and human hepatocytes. *Drug Metab Dispos* 23: 415-421.

Lane, H.Y., Chang, W.H. (1997) The role of the cytochrome P450 system in the metabolism of psychotropic drugs. *Taiwanese J Psychiatry* 11: 345-356.

Lazzeri, N., Belvisi, M.G., Patel, H.J., Yacoub, M.H., Chung, F.K., Mitchell, J.M. (2001) Effects of prostaglandin E<sub>2</sub> and cAMP elevating drugs on GM-CSF release by cultured human airway smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 24: 44-48.

Lewis, R.A., Lee, T.H., Austen, K.F. (1986) Effects of omega-3 fatty acids on the generation of products of the 5-lipoxygenase pathway. *J Lipid Res* 5: 227-238.

Lehmann, J.M., McKee, D.D., Watson, M.A., Willson, T.M., Moore, J.T., Kliewer, S.A. (1998) The human orphan nuclear receptor PXR is activated by compounds that regulate CYP3A4 gene expression and cause drug interactions. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 12208-12213.

Lii, C.K., Ko, J.J., Chen, H.W. (1997) No inhibition of  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase-positive foci by vitamin E with or without Phenobarbital. *Nutr Cancer* 27: 200-205.

Masters, T., Morgan, E.T. (2001) Effects of bacterial lipopolysaccharide on phenobarbital induced CYP2B expression in mice. *Drug Metab Dispos* 29:

252-257.

Mater, M.K., Thelen, A.P., Jump, D.B. (1999) Arachidonic acid and PGE<sub>2</sub> regulation of hepatic lipogenic gene expression. *J Lipid Res* 40: 1045-1052.

Marc, N., Galisteo, M., Lagadic-Gossmann, D., Fautrel, A., Joannard, F., Guillouzo, A., Corcos, L. (2000) Regulation of phenobarbital induction of the cytochrome P450 2b9/10 genes in primary mouse hepatocyte culture. Involvement of calcium and cAMP dependent pathways. *Eur J Biochem* 267: 963-970.

Meydani, S.N., Lipman, R., Blumberg, J.B., Taylor, A. (1990) Dietary energy restriction decreases ex vivo spleen prostaglandin E<sub>2</sub>. *J Nutr* 120: 112-115.

Miles, C.S., Ost, T.W., Noble, M.A., Munro, A.W., Chapman, S.K., Munro, A.W. (2000) Protein engineering of cytochromes-P450. *Biochim Biophys Acta* 1543: 383-407.

Mikkelsen, L., Hansen, H.S., Grunnet, N., Dich, J. (1993) Inhibition of fatty acid synthesis in rat hepatocytes by exogenous polyunsaturated fatty acids is caused by lipid peroxidation. *Biochim Biophys Acta* 1166: 99-104.

Mikkelsen, L., Hansen, H.S., Grunnet, N., Dich, J. (1994) Cytoprotective effect of tocopherols in hepatocytes cultured with polyunsaturated fatty acids. *Lipids* 29: 369-372.

Morkunas, A.R., Miller, M.B. (1997) Anticonvulsant hypersensitivity syndrome. *Critical Care Clinics* 13: 727-39.

Muro, S., Tanaka, I., Usui, T., Kotani, M., Koide, S., Mukoyama, M., Fukata, J., Itoh, H., Narumiya, S., Kawata, M., Nakao, K. (2000) Expression of prostaglandin E receptor EP4 subtype in rat adrenal zona glomerulosa: involvement in aldosterone release. *Endo J* 47: 429-436.

Nemoto, N., Sakurai, J. (1995) Glucocorticoid and sex hormones as activating or modulating factors for expression of Cyp2b9 and Cyp2b10 in the mouse liver and hepatocytes. *Arch Biochem Biophys* 319: 286-292.

Nishigaki, N., Negishi, M., Honda, A. (1995) Identification of prostaglandin E receptor EP2 cloned from mastocytoma cells as EP4 subtype. *FEBS Lett* 364: 339-341.

Okumra, Y., Ishibashi, H., Shirahama, M., Kurokawa, S., Kudo, J., Okubo, H., Niho, Y. (1987) Kupffer cells modulate natural killer cell activity in vitro by producing prostaglandins. *Cell Immun* 107: 89-98.

Omura, T., Sato, R. (1964) The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. *J Biol Chem* 239: 2370-2378.

Parkinson, A. (1996) An overview of current cytochrome P450 technology assessing the safety and efficacy of new materials. *Toxicol Pathol* 24:



45-57.

Peraino, C., Mickael, F., Staffeld, E., Christopher, J.P. (1975) Comparative enhancing effects of phenobarbital, amobarbital, diphenylhydantoin, and dichlorodiphenyltrichloroethane on 2-acetyl-aminofluorene induced hepatic tumorigenesis in the rat. *Cancer Res* 35: 2884-2890.

Peterson, L.D., Thies, F., Sanderson, P., Newsholme, E.A., Calder, P.C. (1998) Low levels of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids mimic the effects of fish oil upon rat lymphocytes. *Life Sci* 62: 2209-2217.

Ramsden, R., Sommer, K.M., Omiecinski, C.J. (1993) Phenobarbital induction and tissue-specific expression of the rat CYP2B2 gene in transgenic mice. *J Biol Chem* 268: 21722-21726.

Raisz, L.G. (1995) Physiologic and pathologic roles of prostaglandins and other eicosanoids in bone metabolism. *J Nutr* 125: 2024S-2027S.

Rahman, M.A., Stork, J.E., Dunn, M.J. (1987) The roles of eicosanoids in experimental glomerulonephritis. *Kidney Int* 32: S40-S48.

Reimer, R., Heim, H.K., Muallem, R., Odes, H.S., Sewing, K.F. (1992) Effects of EP-receptor subtype specific agonists and other prostanoids on adenylate cyclase activity of duodenal epithelial cells. *Prostaglandins* 44: 485-493.

Roberts, Lees.(1990) Omega-3 Fatty Acids In Health And Disease. Chapter1 16.

Rose, D.P., Connolly, J.M. (1990) Effects of fatty acids and inhibitors of eicosanoid synthesis on the growth of a human breast cancer cell line in culture. *Cancer Res* 50: 7139-7144.

Ruch, R.J., Klaunig, J.E. (1986) Effects of tumor promoters genotoxic carcinogens and hepatocytotoxins on mouse hepatocyte intercellular communication. *Cell Biol Toxicol* 2: 469-483.

Sasaki, T., Kobayashi, Y., Shimizu, J., Wada, M., In' nami, S., Kanke, Y., Takita, T. (1998) Effects of dietary n-3-to-n-6 polyunsaturated fatty acid ratio on mammary carcinogenesis in rats. *Nutr Cancer* 30: 137-143.

Salonpaa, P., Pelkonen, O., Kojo, A., Pasanen, M., Negishi, M., Raunio, H. (1994) Cytochrome P450 2A5 expression and inducibility by phenobarbital is modulated by cAMP in mouse primary hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 205: 631-637.

Schlemmer, C.K., Coetzer, H., Claassen, N., Kruger, M.C., Rademeyer, C., Smuts, C.M. (1998) Ectopic calcification of rat aortas and kidneys is reduced with n-3 fatty acid supplementation. *Prostaglandins Leuko Essent Fatty Acids* 59: 221-227.

Schuetz, E.G., Li, D., Omiecinski, C.J., Muller-Eberhard, U., Kleiman, H.K., Elswick, B., Guzelian, P.S. (1988) Regulation of gene expression in adult rat hepatocytes cultured on a basement membrane matrix. *J Cell Physiol* 134:

309-323.

Shaw, P.M., Adenik, M., Weiss, M.C. and Corcos, L. (1993) The phenobarbital-induced transcriptional activation of cytochrome P-450 genes is blocked by the glucocorticoid-progesterone antagonist RU486. *Mol Pharmacol* 44: 775-783.

Seldon, P.M., Barnes, P.J., Meja, K., Giembycz, M. (1995) Suppression of lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor- $\alpha$  generation from human peripheral blood monocytes by inhibitor of phosphodiesterase 4: Interaction with stimulants of adenylyl cyclase. *Mol Pharmacol* 48: 747-757.

Sidhu, J.S., Omiecinski, C.J. (1995) cAMP associated inhibition of phenobarbital-inducible cytochrome P450 gene expression in primary rat hepatocyte cultures. *J Biol Chem* 270: 12762-12773.

Simopoulos, A.P. (2000) Human requirement for n-3 polyunsaturated fatty acids. *Poultry Sci* 79: 961-970.

Simopoulos, A.P. (1991) Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development. *Am J Clin Nutr* 54: 438-463.

Sellmayer, A., Danesch, U., Weber, P.C. (1997) Modulation of the expression of early genes by polyunsaturated fatty acids. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 57: 353-357.

Sinclair, S.B., Greig, P.D., Blendits, L.M. (1989) Biochemical and clinical response of fulminant viral hepatitis to administration of prostaglandin E<sub>1</sub>

preliminary report. *J Clin Invest* 84: 1063-1069.

Singer, P., Berger, I., Moritz, V., Forster, D., Taube, C. (1990) N-6 and n-3 PUFA in liver lipids thromboxane formation and blood pressure from SHR during diets supplement with evening primrose oil, sunflower or fish oil. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 39: 207-211.

Sugimoto, Y., Namba, T., Honda, A. (1992) Cloning and expression of a cDNA for mouse prostaglandin E receptor EP3 subtype. *J Biol Chem* 267: 6463-6466.

Suetsugu, H., Ishihara, S., Moriyama, N., Kazumori, H., Adachi, K., Fukuda, R., Watanabe, M., Kinoshita, Y. (2000) Effect of rebamipide on prostaglandin EP4 receptor gene expression in rat gastric mucosa. *J Lab Clin Med* 136: 50-57.

Testa, B. (1990) Mechanisms of inhibition of xenobiotic metabolizing enzymes. *Xenobiotica* 20: 1129-1137.

Tisdale, M.J. (1993) Mechanism of lipid mobilization associated with cancer cachexia: interaction between the polyunsaturated fatty acid eicosapentaenoic acid and inhibitory guanine nucleotide regulatory protein. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 48: 105-109.

Trottier, E., Belzil, A., Stoltz, C., Anderson, A. (1995) Localization of a phenobarbital-responsive element (PBRE) in the 5'-flanking region of the rat CYP2B2 gene. *Gene* 158: 263-268.

Tsai, C.F., Lii, C.K., Yang, J.J., Liu, K., Lin, W.L., Chen, H.W. (2000) Prostaglandin E<sub>2</sub> is involved in the increase of cytochrome P450 2B1 expression by  $\alpha$ -tocopheryl succinate in primary rat hepatocytes in the presence of phenobarbital. *Nutr Cancer* (in press).

Ueng, T.H., Kang, J.J., Chao, I.C., Chen, Y.I.C. (1995) Cytochrome P450:enzyme regulation and toxicological significance. *J Food Drug Anal* 4: 13-23.

Waggoner, D.W., Bernlohr, D.A. (1990) Evidence for a role of fatty acid binding protein in lipid uptake. *J Biol Chem* 265: 11417-11420.

Waxman, D.J., Morrissey, J.J., Naik, S., Jauregui, H.O. (1990) Phenobarbital induction of cytochromes P450. High-level long-term responsiveness of primary rat hepatocyte cultures to drug induction, and glucocorticoid dependence of the phenobarbital response. *Biochem J* 271: 113-119.

Waxman, D.J., Azaroff, L. (1992) Phenobarbital induction of cytochrome P450 gene expression. *Biochem J* 281: 577-592.

Watabe, A., Sugimoto, Y., Honda, A. (1993) Cloning and expression of DNA for a mouse EP1 subtype of prostaglandin E receptor. *J Biol Chem* 268: 20175-20178.

Watkins, B.A., Xu, H., Turek, C.B. (1996) Linoleate impairs collagen synthesis in primary cultures of avian chondrocytes. *Proc Soc Exp Biol Med* 212: 153-159.

Weber, P.C., Leaf, A. (1991) Cardiovascular effects of omega-3 fatty acids. Atherosclerosis risk factor modification by omega-3 fatty acids. *World Rev Nutr Diet* 66: 218-232.

Weber, P.C., Fischer, C. Schacky, R. Lorenz, T. (1986) Dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids and eicosanoid formation in man. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 57: 49-60.

Williams, R.T. (1971) *Detoxification Mechanisms*, 2nd ed. New York: Wiley. Chapter 6 114.

Wrighton, S.A., Stevens, J.C. (1992) The human hepatic cytochromes P-450 involved in drug metabolism *Crit Rev Toxicol* 22: 1-22.

Wu, S., Chen, W., Murphy, E., Gabel, S., Tomer, K.B., Foley, J., Steenbergen, C., Falck, J.R., Moomaw, C.R., Zeldin, D.C. (1997) Molecular cloning expression and functional significance of a cytochrome P450 highly expressed in rat heart myocytes. *J Biol Chem* 272: 12551-12559.

Yang, C.S., Yoo, J-S.H. (1988) Dietary effects on drug metabolism by the mixed-function oxidase system. *Pharmacol Ther* 38: 53-72.

Yoo, J-S.H., Smith, T.J., Ning, S.M., Lee, M.J., Thomas, P.E., et al. (1992) Modulation of the levels of cytochrome P450 in rat liver and lung by dietary lipid. *Biochem Pharmacol* 43: 2535-2542.

Yoo, J-S.H., Ning, S.M., Pantuck, C.B., Pantuck, E.J., Yang, C.S. (1991)

Regulation of hepatic microsomal cytochrome P450 2E1 level by dietary lipids and carbohydrates in rats. *J Nutr* 121: 959-965.

Yoo, J-S.H., Hong, J.Y., Ning, S.M., Yang, C.S. (1990) Roles of dietary corn oil in the regulation of cytochromes P450 and glutathione S-transferases in rat liver. *J Nutr* 120: 1718-1726.

Zhuang, D., Kawajiri, H., Takahashi, Y., Yoshimoto, T. (2000) Suppression of prostaglandin E<sub>2</sub>-mediated c-fos mRNA induction by interleukin-4 in murine macrophages. *J Biochem* 127: 451-456.